



Etude de la toxicité de la sulcotrione et de ses produits de photodégradation

Eric Goujon

► To cite this version:

Eric Goujon. Etude de la toxicité de la sulcotrione et de ses produits de photodégradation. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF22568 . tel-01229766

HAL Id: tel-01229766

<https://theses.hal.science/tel-01229766>

Submitted on 17 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Blaise Pascal
N°D.U. 2568

Université d'Auvergne
Année : 2015

**Ecole Doctorale Sciences de la Vie,
Santé, Agronomie, Environnement**

N°d'ordre : 665

Thèse :

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université
Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires

Soutenue le : 30 Avril 2015

Eric GOUJON

**Etude de la toxicité de la sulcotrione et de ses produits de
photodégradation.**

M Ezzeddine FERJANI (Professeur, Université de Carthage, Bizerte)	Président
Mme Huguette SALLANON (Professeur, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse)	Rapporteur
Mme Alexandra ter HALLE (Chargée de Recherche CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse)	Rapporteur
Mme Pascale GOUPIL (Maître de conférences, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)	Examineur
Mme Claire RICHARD (Directeur de Recherche CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)	Examineur
M Gérard LEDOIGT (Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)	Examineur

Laboratoire de Physiologie Intégrée de l'Arbre Fruitier et Forestier (UMR 547 PIAF)
Laboratoire de photochimie de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, (UMR 6296)
Université Blaise Pascal

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été effectués au sein de l'UMR 547-UBP/INRA Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier (PIAF) et le laboratoire de photochimie de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF) de l'Université Blaise Pascal (UBP).

Je remercie Le FEDER et la région Auvergne pour le soutien financier qu'ils m'ont apporté.

Je tiens à remercier le professeur Jean-Louis JULIEN pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Un grand merci à mes encadrants de thèse : Au professeur Gérard LEDOIGT qui a su me faire confiance pour la réalisation de ce projet. A Pascale GOUPIL pour son aide scientifique. A Claire RICHARD qui a toujours su trouver un moment pour m'initier au domaine de la photochimie.

Merci à toute l'équipe du PIAF pour m'avoir formé et soutenu durant toutes ces années.

Merci à l'équipe de photochimie pour m'avoir guidé dans leurs laboratoires et évité d'appuyer sur le « mauvais bouton ».

Merci à Aurélien avec qui j'ai eu grand plaisir de travailler durant ma première année.

Merci à Céline, Christelle, Dominique, Stéphanie et Margot qui m'ont beaucoup aidé lors de mes travaux.

Un merci tout particulier à Marie-Anne et Sandra qui m'ont supporté comme encadrant de stage de master, ce fut pour moi une très bonne expérience !

Merci à tous les stagiaires qui sont passés au PIAF durant ces 3 années, c'est vous qui donnez vie au laboratoire ! De sacrés fifous et quelques roux !!

Merci à Aude et Marine qui ont toujours été présentes et qui me manquent beaucoup aujourd'hui.

Merci à Kevin, Marie, Lise, et Jeanne qui sont aussi des victimes du syndrome « thèse » et avec qui j'ai toujours pu discuter franchement, vous êtes géniaux !!!

Un merci plus spécial à Razik avec qui j'ai partagé un bureau, beaucoup de temps, des cafés, de la science et de très bons moments.

Une dédicace spéciale à Boris pour ses conseils et son aide avant ou après 18h.

Merci au phoque *off* ma petite mascotte.

Enfin je ne remercie pas Disney pour « libérée, délivrée » et « it's a small world » qui ont bien failli me rendre fou ! Le singe peut en témoigner...

Sommaire

Sommaire	1
Liste des abréviations	5
Introduction et objectifs	7
Synthèse bibliographique.....	9
1. Les pesticides.....	10
1.1. Définition.....	10
1.2. Historiques	10
1.3. Classification des pesticides.....	11
1.4. Consommation.....	11
1.5. La transformation des pesticides dans l'environnement	12
1.6. La toxicité des pesticides et de leurs produits de transformation	14
2. La sulcotrione	16
2.1. Historique.....	16
2.2. Utilisation	17
2.3. Mode d'action	18
2.4. Dissipation.....	19
3. La génotoxicité	20
3.1. Définition.....	20
3.2. Les tests génotoxicologiques.	22
3.3. Les modèles végétaux.....	30
Matériels et méthodes.....	33
1. Etude génotoxique et élongation racinaire	34
1.1. Traitements et prélèvements	34
1.2. Croissance racinaire	36

1.3. Coloration des extrémités racinaires	36
1.4. Observation microscopique	37
2. Etude de la photo-transformation de la sulcotrione	40
2.1. La sulcotrione	40
2.1.1. Enceintes d'irradiations.....	41
2.2. Solutions irradiées de sulcotrione	43
2.3. Production de XDD.....	43
2.4. Le CMBA	44
3. Etude Analytique	46
3.1. Spectroscopie UV-Visible	46
3.2. Chromatographie en phase liquide en haute pression	46
3.3. Spectrométrie de masse	46
4. Etudes statistiques	47
Résultats	49
Chapitre 1: Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on <i>Allium cepa</i> root meristem.....	50
1. Contexte	50
2. Résultats et interprétations	50
3. Conclusions.....	51
Chapitre 2: Cytotoxicity on <i>Allium cepa</i> of the two main sulcotrione photoproducts, xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl and 2-chloro-4-methylbenzoic acid. ...	72
1. Contexte	72
2. Résultats	72
3. Conclusions.....	73
Chapitre 3: Etude de l'effet des produits de phototransformation de la sulcotrione sur la croissance racinaire.	89

1. Synthèse de XDD et caractérisation de ses produits d'hydrolyse.....	90
1.1. Synthèse de XDD	90
1.2. Transformation de XDD	92
1.3. Caractérisation des produits de transformation de XDD	93
1.4. Calculs des concentrations des produits de dégradation de XDD	100
2. Effets des différents mélanges et des molécules seules sur les modèles végétaux..	102
2.1. Effets de CMBA sur la croissance racinaire d' <i>Allium Cepa</i>	102
2.2. Effets de XDD en cours d'hydrolyse sur la croissance racinaire d' <i>Allium Cepa</i> ...	103
2.3. Effets de XDD totalement hydrolysé sur la croissance racinaire.....	109
2.4. HMBA : molécule candidate comme stimulateur de croissance racinaire.....	117
3. Discussion	120
Discussion générale	123
1. Réflexion sur la méthode	125
2. Réflexion sur le modèle d'étude	126
3. Formations de XDD et de HMBA	127
4. Dynamique de toxicité	129
5. HMBA, un stimulateur de croissance issu d'un pesticide	130
Conclusions	133
Références Bibliographiques	137
Récapitulatif d'activités 2011-2014	148

Liste des abréviations

8-oxo-dG : 8-hydroxyguanine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANR : Agence nationale de la recherche

CHD : 1,3-cyclohexanedione

CMBA : Acide 2-chloro-4-méthylsulfonylbenzoïque

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

ES⁻ : « Electrospray » négatif

ES⁺ : « Electrospray » positif

FUI : Fonds unique interministériel

H₂O : Monoxyde de dihydrogène (Eau)

HCL : Acide chlorhydrique

HMBA : Acide 2-hydroxy-4-méthylsulfonylbenzoïque

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute pression

HPPD : 4-hydroxyphénylpyruvate-dioxygénase

HSD : honest significant difference

ICCF : Institut de Chimie de Clermont-Ferrand

NHEJ : Nonhomologous DNA End Joining

PIAF : Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier

POP : Polluants Organiques Persistants

SA : Acide salicylique

SE : Erreur standard

TdT : Désoxynucléotidyle transférase

TUNEL : TdT-mediated dUTP nick end labeling

UBP : Université Blaise Pascal

UMR : Unité mixte de recherche

UV : Ultra violet

XDD : Xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl

Introduction et objectifs

L'équipe UMR 547 PIAF UBP-INRA, développe un programme (à soutien financier par ANR et FUI) depuis 2008 axé sur les effets dérivés des pesticides et sur une diminution de leur utilisation. Ce programme s'intègre dans le contexte écologique actuel relatif au Plan « EcoPhyto 2018 » issu du Grenelle de l'environnement. Il est issu d'une collaboration entre les équipes de recherche, PIAF UMR 547 UBP-INRA et l'équipe de photochimie de l'ICCF UMR 6505 UBP-CNRS. Ces travaux de thèse se placent dans le cadre du CPER Environnement 2010 établi par la Fédération de Recherche en Environnement de l'Université Blaise Pascal et du CNRS.

Les pesticides sont des substances destinées détruire les ravageurs et lutter contre les pathogènes. Ils sont largement utilisés dans l'agronomie pour assurer la protection et la qualité des produits cultivés. L'utilisation de ces molécules chimiques est importante. Elles peuvent être retrouvées dans l'environnement et dans notre alimentation. De plus, ces molécules peuvent subir des modifications structurales selon les conditions de leur environnement après leur utilisation. En effet plusieurs voies de dissipation des pesticides existent. Ils peuvent être transformés et transportés dans de nouveaux compartiments environnementaux. La dissipation de ces composés peut aggraver les pollutions de l'environnement et les contaminations de l'être humain.

Le phénomène de phototransformation est une voie majeure de dissipation des pesticides à la surface des feuilles. Plusieurs pesticides ont fait l'objet d'analyses photochimiques et ont été testés pour leur stabilité chimique après irradiation dans l'unité de recherche de l'ICCF. Le phénomène de phototransformation limite considérablement la longévité des matières actives et libère des photoproduits qui, en général, ne possèdent plus l'activité spécifique, par exemple herbicide, de départ et dont l'impact toxicologique doit être évalué.

La sulcotrione est un herbicide de la famille des tricétones qui est sensible à l'irradiation. Les produits de transformation de cet herbicide ont été caractérisés par le laboratoire de photochimie de l'ICCF. Notre travail a pour objectif d'analyser la réponse de la plante face aux molécules issues de cette phototransformation. La cytotoxicité et la génotoxicité des photoproduits de la sulcotrione ont été évaluées chez *Allium cepa* L. var.

aggregatum. Les méthodes sélectionnées pour déterminer la toxicité de ces molécules est fondée sur des mesures de la croissance racinaire, de l'indice mitotique ainsi que celles de la fréquence des anomalies chromosomiques apparaissant dans les méristèmes racinaires.

Ce travail s'est déroulé en trois phases permettant de définir la toxicité de la molécule active et de ses produits de transformation.

1) Nous avons déterminé la toxicité de la sulcotrione seule ou présente en mélange avec ses photoproduits. Nous avons travaillé avec différentes proportions du mélange en favorisant soit la sulcotrione soit ses produits de transformation pour identifier lequel de ces composés est le plus impactant sur le développement végétal.

2) Nous avons évalué le potentiel toxique de chaque produit de transformation séparément sur des gammes de concentrations. Ce travail est réalisé sur L'acide 2-chloro-4-méthylsulfonylbenzoïque (CMBA) et le 1,9-dione-3,4-dihydro-6-méthylsulfonyl xanthène (XDD) qui sont les principaux produits de photo-transformation de la sulcotrione lorsque celle-ci est en milieu acide.

3) Nous avons identifié et caractérisé des produits de seconde génération obtenus après hydrolyse du XDD. Parmi les composés hydrolysés, nous avons retenu un principe actif ayant une action stimulatrice de la croissance racinaire. Ce composé, l'acide 2-hydroxy-4-méthylsulfonylbenzoïque (HMBA), a été identifié comme étant un dérivé de l'acide salicylique.

Synthèse bibliographique

1. Les pesticides

1.1. Définition

Les pesticides sont utilisés pour protéger les cultures et les produits récoltés contre les attaques d'organismes nuisibles tels que les champignons, les insectes, les acariens ou encore à détruire les adventices ou "mauvaises herbes". Leur utilisation peut aller de l'application en champ, jusqu'au désherbage des lieux publics, des voies ferrées (300 tonnes d'herbicides en France par an), la désinfection des silos, le traitement des jardins et des espaces verts (1500 tonnes) (Benoît *et al.*, 2005). Il faut également souligner l'existence de pesticides réservés à des usages domestiques tels la destruction des rats, souris, blattes, mites ou encore la protection des bois contre les champignons ou les termites.

1.2. Historique

La lutte contre les pathogènes a commencé avec le soufre et avec des sels de cuivre comme la bouillie bordelaise. Le soufre était utilisé dans la Grèce antique (Homère 1000 ans avant J.-C.) ainsi que l'arsenic en tant qu'insecticide par les romains. Les produits chimiques utilisés pour la lutte contre les nuisibles se sont développés au cours du XIX^{ème} siècle. Leur utilisation a permis l'augmentation des rendements agricoles, une meilleure qualité des produits alimentaires et ont permis de contrer les apparitions successives de graves épidémies comme le mildiou de la pomme de terre en Irlande qui avait entraîné de grandes famines.

Au XX^{ème} siècle, l'usage des composés à base d'arsenic fut très répandu notamment pour lutter contre les insectes. Les premiers pesticides de synthèse sont apparus vers 1930, grâce au développement de la chimie organique durant la première guerre mondiale. Le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) a été synthétisé pour la première fois en 1874 par Zeidler et a été utilisé comme insecticide par la société Ciba-Geigy en 1939. Le DDT, le premier organochloré, a été très utilisé jusqu'en 1970 et a permis de lutter notamment contre la malaria (maladie propagée par des moustiques). Aujourd'hui plusieurs composés de ce type sont classés comme des pesticides organiques persistants et sont interdits en raison de leur accumulation dans l'environnement.

L'utilisation des pesticides a augmenté jusqu'à aujourd'hui. Les molécules actives et leurs modes d'application se sont diversifiés pour obtenir des rendements agricoles plus

élevés et garantir une meilleure protection des produits alimentaires. Des insecticides de plus en plus efficaces ont été découverts, comme les organophosphorés et les pyréthriinoïdes. Dans la catégorie des herbicides les triazines, les aminophosphonates ou encore les sulfonilurées sont devenus les familles les plus efficaces et les plus utilisées.

1.3. Classification des pesticides

Les pesticides, ou produits phytopharmaceutiques, rassemblent près de 800 principes actifs différents commercialisés sous différentes formes et formulés avec des adjuvants qui améliorent leur spécificité d'action. Les pesticides sont classés selon la nature de l'espèce vivante ciblée.

Les insecticides, luttent contre les ravageurs de culture (insectes), ce sont par exemple des toxines neurotropes (les organochlorés) ou des perturbateurs de la respiration cellulaire, ou de la formation de la chitine.

Les fongicides, luttent contre les champignons phyto-pathogènes responsables des maladies de plante notamment le mildiou, les charbons ou les rouilles. Leurs modes d'action sont variés et ils peuvent avoir des propriétés inhibitrices des mécanismes de la respiration, de la division cellulaire ou de la biosynthèse des stérols. Ils peuvent aussi déstabiliser la biosynthèse des acides aminés, des protéines, glucides ou des polyols du bio-agresseur.

Les herbicides luttent contre les adventices. Ils constituent la famille la plus utilisée. Il y a plus de 35 familles chimiques différentes. Ils ont des modes d'action très variés pour un spectre d'action large. Ils peuvent perturber la régulation de l'auxine, inhiber des mécanismes liés à la photosynthèse, à la division cellulaire, à la synthèse des lipides, de cellulose ou d'acides aminés. Les tricétones ont une action sur la synthèse des caroténoïdes.

On distingue aussi les acaricides, les nématicides, les rodenticides (contre les rongeurs), les taupicides, les molluscicides, etc.

1.4. Consommation

Plus de 800 substances actives de diverses origines pouvaient être utilisées en tant que phytopharmaceutiques en Europe avant 1993. Suite à cette date, les homologations nationales et européennes ont eu pour conséquence de réévaluer les normes d'un point de

vue écotoxicologique. Cela a entraîné une réévaluation de nombreux principes actifs et le retrait progressif de nombreux produits. En France, 40 % de ventes totales de pesticides sont des herbicides, 30 % sont des fongicides et 20 % sont des insecticides.

Les ministères de l'environnement de plusieurs pays ont pour objectif de diminuer plus fortement encore l'utilisation de ces substances qui sont pour la plupart nocives pour l'environnement mais aussi pour les êtres vivants en général (Aubertot et Carpentier, 2011). Le plan écologique issu du Grenelle de l'environnement 2008 a pour objectif de réduire de 50% l'usage des pesticides. Malgré cela on peut observer aujourd'hui que la diminution par deux de la consommation de ces substances (plan « écophyto 2018 ») reste encore irréalisable.

1.5. La transformation des pesticides dans l'environnement

Les phénomènes de dissipation des pesticides dans l'environnement font intervenir l'hydrolyse, la photodégradation et la biodégradation.

L'hydrolyse est une réaction des pesticides avec l'eau. Ce type de réaction est généralement lent à moins d'être catalysé (Chamberlain *et al.*, 2012; Sogorb *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013). L'hydrolyse d'une molécule organique est principalement la réaction d'une molécule d'eau provoquant une catalyse spécifique par un proton ou un groupement hydroxyle. Bien que les hydrolyses dépendent de la structure chimique du pesticide, elles ne suivent pas toujours les mêmes mécanismes au sein d'une même classe chimique. Par exemple, les pesticides organophosphorés sont principalement sensibles à une hydrolyse alcaline, alors que les phosphorothioates sont labiles en milieu acide. Ces réactions peuvent être catalysées, par exemple, par de la matière organique dissoute, des ions métalliques, des oxydes métalliques, ou des argiles. Il est donc difficile de prédire en laboratoire les réactions d'hydrolyse car les facteurs multiples du milieu (pH, compositions du sol,...) ont beaucoup d'influences. De plus, les pesticides sont généralement appliqués sous forme commerciale comprenant d'autres éléments de formulation qui vont modifier l'hydrolyse (Katagi, 2002).

La lumière solaire peut également induire la transformation des pesticides dans tous les compartiments : eau, sol, surface des végétaux (Burrows *et al.*, 2002; García et Amat-Guerri, 2005). Les composés qui absorbent la lumière solaire c'est-à-dire les longueurs d'onde supérieures à 290 nm peuvent potentiellement se photolyser. L'énergie absorbée via

le photon fait passer un des électrons des couches périphériques dans une orbitale d'énergie supérieure rendant la molécule très instable. Ces états dits « excités » ont une durée de vie très courte ; ils peuvent utiliser l'énergie emmagasinée de différentes manières. Elle peut être restituée au milieu sous forme de chaleur ou d'énergie lumineuse (fluorescence) ou permettre des modifications chimiques de la molécule initiale (isomérisation, cyclisation, coupure, addition, production de radicaux, réactions d'oxydoréduction, etc...). L'importance relative de tous ces processus dépend totalement de la molécule et les études de réactivité photochimique sont des études au cas par cas. Les composés qui n'absorbent pas la lumière solaire peuvent également subir des phototransformations par voie indirecte. Ce deuxième type de réaction met en jeu des photoinducteurs ou photosensibilisateurs qui vont absorber la lumière et permettre la transformation des pesticides via le plus souvent des réactions d'oxydation. La matière organique abondamment présente dans les eaux de surface et le sol est un exemple de photosensibilisateur (Burkhard et Guth, 1976; El Gaini *et al.*, 2010; Ivie et Casida, 1971).

La biodégradation est généralement reconnue comme une voie importante pour la dégradation des pesticides. Tandis que les plantes, les animaux et les champignons transforment généralement les pesticides par le biais d'enzymes à large spectre ou grâce à leurs systèmes de détoxification, les bactéries vont, de manière plus générale, les métaboliser pour les assimiler comme éléments nutritifs (Van Eerd *et al.*, 2003). Par exemple, les esters organophosphorés interfèrent avec les transmissions nerveuses chez les insectes alors que ces molécules n'affectent pas les processus microbiens et peuvent donc servir de sources de carbone et de phosphore pour les microorganismes qui possèdent les enzymes capables d'hydrolyser les phospho-triesters (Munnecke, 1976; Singh et Walker, 2006). Il a été mis en évidence que les microorganismes du sol peuvent s'adapter et « consommer » ces pesticides limitant ainsi leur accumulation (Sørensen *et al.*, 2003; Topp, 2003). Ces données montrent que Les bactéries ont plus de chance de posséder ces enzymes de biodégradation en raison de leur capacité à évoluer rapidement et de générer de nouvelles voies métaboliques pour fournir les nutriments nécessaires à la cellule (Copley, 2009). En outre, les transferts de gènes de biodégradation sont possibles au sein des populations microbiennes et ainsi accélérer la diffusion de ces voies de biodégradation nouvellement acquises (De Souza *et al.*, 1998).

1.6. La toxicité des pesticides et de leurs produits de transformation

Dans l'environnement les pesticides ne sont pas inertes, ils sont mobiles et ont une existence dynamique. Leur mobilité est possible grâce à différents mécanismes de dispersion (figure. 1). Suite à l'application du pesticide sous sa forme commerciale, cette solution se répartit entre la plante, le sol et l'atmosphère. Les pesticides déposés sur les plantes et le sol sont lessivés par l'eau de pluie et la rosée et vont alors ruisseler puis s'infiltrer dans les sols. A partir de ce moment ils pourront contaminer les eaux de surface ou les eaux souterraines (Chiron *et al.*, 2009; Grippa *et al.*, 2012). Une autre partie des produits phytosanitaires va être entraînée par le vent lors de l'application et se retrouver dans l'atmosphère. Que cela soit par les eaux ou par l'air les molécules contenues dans les pesticides pourront aller contaminer des milieux qui n'étaient pas initialement des cibles.

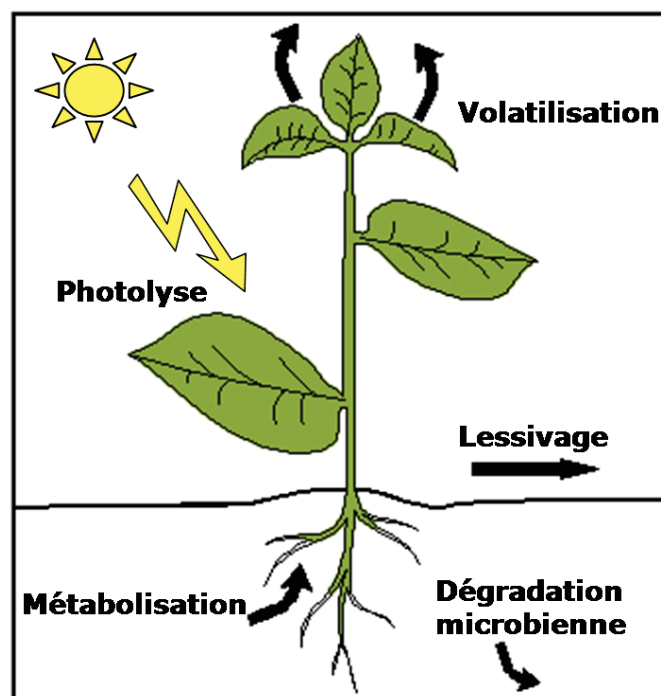


Figure 1 : Schéma de la dissipation des produits phytosanitaires en conditions naturelles.

Les pesticides présentent une demi-vie qui leur est propre une fois introduits dans l'environnement. Ces molécules chimiques peuvent subsister quelques heures, jours, ou même plusieurs années selon le type de molécule et le milieu dans lequel elles se retrouvent. Les Polluants Organiques Persistants (POPs) par exemple se dégradent difficilement dans l'environnement. Ils s'accumulent dans les graisses des organismes vivants

et sont transmis dans la chaîne alimentaire. Ces pesticides sont normalement interdits d'utilisation en France et en Europe à cause de leurs caractères persistants et bioaccumulables ayant de graves conséquences sur la santé et l'environnement. Le chlordécone est par exemple très stable et pose de nombreux soucis d'un point de vue écotoxicologique en Martinique où la molécule s'accumule et persiste à longs termes (Luellen *et al.*, 2006).

Suite à leurs mobilités et leurs modifications structurales, les matières actives peuvent avoir des impacts variés sur l'environnement. Les molécules de synthèse ne se limitent pas seulement aux espèces cibles et peuvent perturber la biodiversité. Elles sont aussi potentiellement toxiques pour l'homme (Graillet *et al.*, 2012). Elles peuvent aussi avoir un effet direct ou indirect sur l'organisme, en mimant par exemple certaines hormones (Keil *et al.*, 1976). De plus, il est difficile d'estimer les effets sur les écosystèmes d'une pollution liée aux pesticides, car il existe plusieurs formulations pour une même matière active. Les composants de la formulation peuvent aussi être des polluants en agissant en synergie avec le principe actif du pesticide (Grisolia *et al.*, 2004). Les pesticides formulés peuvent donc avoir des répercussions sur la biodiversité qui sont dépendantes de leur mode d'action, de leur demi-vie et de leurs produits de transformation qui peuvent être plus toxiques et s'accumuler plus facilement que la molécule mère (Escher et Fenner, 2011; Mottier *et al.*, 2013; Phugare *et al.*, 2012).

De plus, l'épandage répété de pesticides de nature variée entraîne la formation de cocktails de substances potentiellement dangereuses qui peuvent agir de façon additive ou synergique sur l'environnement (Hernández *et al.*, 2012). Leurs effets sur les êtres vivants dépendent principalement de leur structure chimique.

Les pesticides peuvent finalement contaminer nos aliments (Feretti *et al.*, 2007). L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a indiqué que des résidus de pesticides ont été détectés dans 46,7% des échantillons d'aliments analysés dans l'Union européenne en 2008. Les résidus d'au moins deux pesticides ont été trouvés dans 27% des échantillons analysés, parmi lesquels un tiers contenait des résidus de plus de quatre pesticides différents (EFSA, 2010). On peut noter que l'évaluation des risques liés aux pesticides sur la santé humaine est fondée sur une évaluation individuelle, sans prendre en

compte les effets synergiques possibles des cocktails de molécules. De plus, la dissipation de ces produits et leur bioaccumulation peuvent entraîner des pollutions à grandes échelles et à grandes distances. Au milieu des années 80 par exemple, des études scientifiques ont révélé la présence à des taux élevés de nombreux pesticides dans le sang et les tissus adipeux des Inuits du Grand Nord canadien (Dewailly *et al.*, 2000).

La toxicité potentielle des pesticides peut avoir des répercussions sur l'intégrité de notre génome, notamment en entraînant des cas de cancers. Des travaux scientifiques ont pu associer les dommages de l'ADN et l'apparition de cancers chez les utilisateurs réguliers comme les agriculteurs (Bolognesi *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2003; Viel et Challier, 1995; Weichenthal *et al.*, 2010). Il faut aussi souligner le risque accru de cancers chez les enfants dont les parents ont été mis en contact avec certains pesticides (Flower *et al.*, 2004). Mais les risques d'anomalie au niveau de l'ADN peuvent aussi survenir après l'ingestion de substances toxiques comme les pesticides et leurs résidus. Cette problématique contemporaine sur la pollution alimentaire soupçonnée est de plus en plus travaillée pour évaluer les risques pour la santé humaine (Culleres *et al.*, 2008; Tron *et al.*, 2001).

2. La sulcotrione

2.1. Historique

La présence de composés β -tricétoniques d'origine naturelle a été décrite par Hellyer dans des huiles volatiles de certaines plantes australiennes appartenant à la famille des myrtacées (Hellyer, 1968). La découverte de leur action en tant qu'inhibiteur de HPPD a été faite par Reed Gray en 1977. Cet auteur avait observé dans le cadre de son activité domestique, une absence de mauvaises herbes à proximité d'un petit arbuste décoratif, *Callistemon citrinus*. Il détermina qu'une molécule, la leptospermone (figure 2), était à l'origine d'un blanchiment des feuilles chez de jeunes plantules.

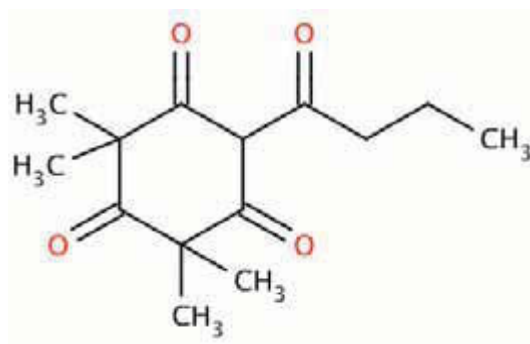


Figure 2 : Formule développée de la leptospermone.

La leptospermone est à la base du développement des herbicides de la famille des tricétones. Des dérivés du 2-benzoyl-1,3- cyclohexanedione ont été synthétisés par Michaely et Kratz en 1986 pour obtenir une activité herbicide plus efficace. Lee et collaborateurs ont décrit les relations entre la structure et l'activité de cette famille de molécules ; la présence d'un substituant en position *ortho* sur le noyau aromatique est nécessaire pour obtenir une action herbicide (Lee *et al.*, 1998). Ainsi, deux molécules ont été développées puis commercialisées : la mésotrione (Callisto®) et la sulcotrione (Mikado®).

2.2. Utilisation

La sulcotrione [2-[2-chloro-4-(méthylsulfonyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione] est un herbicide foliaire utilisé en post-levée des adventices au stade de 4 à 6 feuilles du maïs, mais peut aussi être utilisé en pré-émergence et en pré-semis. Cet herbicide a été découvert par Syngenta et mis sur le marché en Europe par Bayer Crop Science sous les noms commerciaux de Cornbest®, Cornet®, Cortes®, Cube®, Gecko®, Sulko®, Termika® et Mikado®.

Les doses d'application recommandées sont de l'ordre de 300 à 450 g.ha⁻¹ (Mamy *et al.*, 2005). En supposant que la densité de population de maïs est de 100 000 plants par hectares et que l'application est réalisée à 300 g de sulcotrione par hectare, cela correspond à une concentration de 3 mg de substance active par plante (ou 30 mg / m²). La sulcotrione est utilisée pour le désherbage en France, seule ou en association avec d'autres herbicides (bromoxynil, isoxaflutole, acétochlore, mésotrione ou nicosulfuron) afin d'augmenter

l'efficacité du traitement tout en diminuant les doses d'application (Chaabane *et al.*, 2005). Elle présente un large spectre d'action et couvre donc une très large gamme d'adventices.

2.3. Mode d'action

La sulcotrione peut être absorbée et agir principalement par voie foliaire (Lee *et al.*, 1998) mais également par les racines, en conditions humides (Cools *et al.*, 1999). Le mode d'action des tricétones au niveau des plantes est lié à l'inhibition par compétition de la 4-hydroxyphénylpyruvate-dioxygénase (HPPD) (Secor, 1994). HPPD existe chez les procaryotes et les eucaryotes et catalyse la seconde étape de la transformation de la tyrosine en plastoquinone. Si cette enzyme est inhibée cela va empêcher la dégradation de la tyrosine et l'acide aminé va s'accumuler. L'inhibition de HPPD empêche la formation de l'acide homogentisique qui est un précurseur essentiel pour la biosynthèse de tocophérols (vitamine E) et de plastoquinones. La plastoquinone-9 est un co-facteur de la phytoène-désaturase, une enzyme impliquée dans la synthèse des caroténoïdes (Moran, 2005) (figure 3). Les herbicides tricétoniques agissent donc indirectement sur la production des carotènes qui jouent un rôle important dans le mécanisme photosynthétique. Ils transfèrent l'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle, désactivent l'oxygène singulet et protègent les tissus végétaux. Le traitement des organismes photosynthétiques par les herbicides tricétoniques entraîne le blanchiment des jeunes feuilles 3 à 4 jours après l'application (Lee et Michaely, 1988; Mayonado *et al.*, 1989; Sandmann *et al.*, 2013). On observe alors une diminution du taux de chlorophylles et de caroténoïdes ainsi que l'accumulation massive de phytoène. Cela s'accompagne rapidement d'une nécrose puis de la mort des plantes par photo-oxydation de la chlorophylle et destruction des membranes cellulaires qui ne sont plus protégées par les carotènes dont la production est arrêtée. Les herbicides tricétoniques ne causent pas de blanchiment des tissus mûres qui possèdent déjà leur stock de carotènes, ils vont donc avoir des effets principalement sur de jeunes feuilles. Cependant, la plastoquinone est aussi un transporteur mobile d'électrons de l'appareil photosynthétique II (Ferreira *et al.*, 2004). La plante subit donc un grave stress oxydant dû au manque de tocophérols et de caroténoïdes. Dans les organes matures, le traitement par les tricétones perturbe donc la chaîne de transfert d'électrons photosynthétiques, bloquant ainsi le mécanisme vital de production d'énergie au sein de la plante.

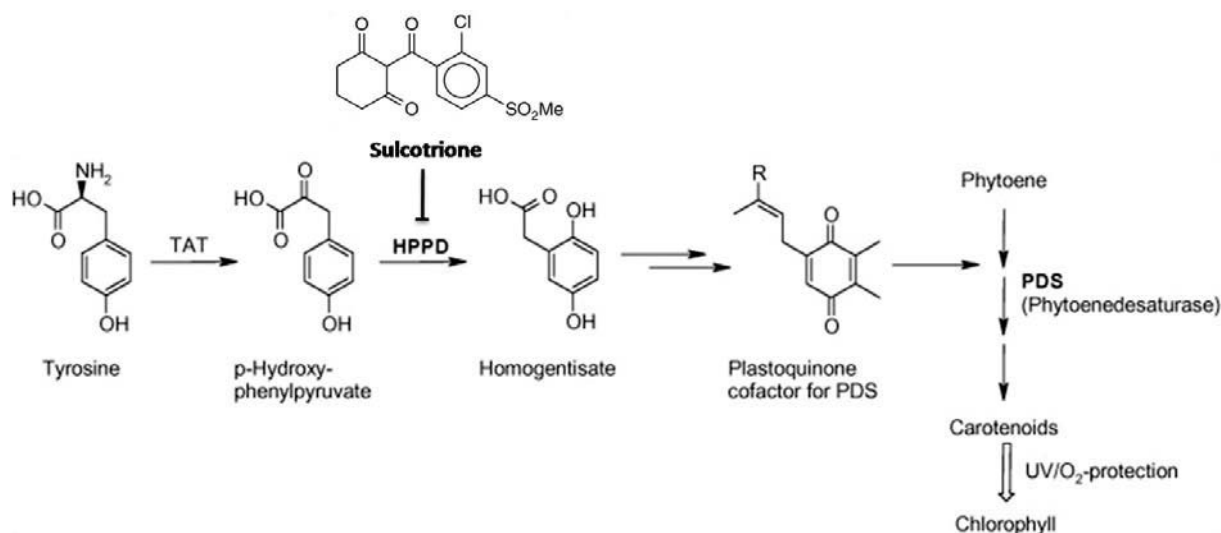


Figure 3 : Mode d'action de la Sulcotrione sur la voie de biosynthèse des caroténoïdes.

2.4. Dissipation

La persistance de la sulcotrione dans l'environnement dépend des phénomènes de dissipation biotiques et abiotiques après la pulvérisation au champ.

Dans les sols, la sulcotrione a une demi-vie qui varie entre 15 et 120 jours selon les conditions en champ et les types de sol (Rouchaud *et al.*, 1996; Rouchaud *et al.*, 1998a; Rouchaud *et al.*, 1998b). Cette tricétone est modifiée selon plusieurs paramètres physico-chimiques comme l'humidité, la température, le pH ou la composition des sols (Chaabane *et al.*, 2005; Chaabane *et al.*, 2008; Cherrier *et al.*, 2004; Doublet *et al.*, 2009; Mamy *et al.*, 2005). Les transformations se font par hydrolyse ou par l'action des microorganismes. La sulcotrione est mobile pendant plus de 30 jours après l'application dans les sols et peut contaminer les eaux de surface et souterraines (Chaabane *et al.*, 2008). L'acide 2-chloro-4-méthylsulfonylbenzoïque (CMBA) (figure 21) et le 1,3-cyclohexanedione (CHD) sont les métabolites majoritaires retrouvés dans les couches superficielles du sol (Cherrier *et al.*, 2004). Ces métabolites ne présentent pas d'activité herbicide

Dans les eaux de surface les phénomènes de dissipation sont la biotransformation, la phototransformation et l'hydrolyse. Ces processus sont fortement influencés par le pH mais les eaux de ruissellement sont en général proches de la neutralité.

L'irradiation de la sulcotrione en milieu aqueux neutre avec une intensité de rayonnement sensiblement identique à celle du soleil induit une photo-transformation très lente. Dans ces conditions expérimentales, moins de 10% de la sulcotrione est transformée après 6 h d'irradiation. La réaction principale observée est une photohydrolyse générant CMBA et CHD (Chaabane *et al.*, 2005). En revanche, la phototransformation est beaucoup plus rapide sous forme moléculaire pour laquelle une conversion de 50 % de la sulcotrione est mesurée après une heure d'irradiation à pH 2,5 par exemple (ter Halle *et al.*, 2009). De plus la réactivité de la sulcotrione change totalement. Le principal photoproduit devient le 1,9-dione-3,4-dihydro-6-méthylsulfonyl xanthène (XDD) (ter Halle *et al.*, 2006). Ce xanthène est généré par élimination de HCl suivie d'une cyclisation. Le mécanisme précis de cette réaction n'est pas connu, mais on peut supposer que sous forme protonnée l'équilibre céto-énolique est déplacé vers la forme énol et qu'une réaction intramoléculaire où l'oxygène joue le rôle de nucléophile peut alors avoir lieu lorsque les deux sont en position favorable (figure 4).

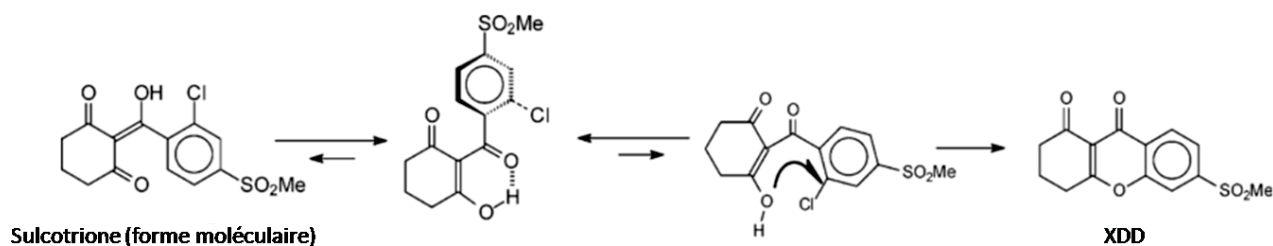


Figure 4 : Cyclisation de la sulcotrione sous forme moléculaire en XDD par phototransformation. D'après ter Halle et al., 2006.

3. La génotoxicité

3.1. Définition

La molécule d'ADN, support physique de l'hérédité, assure le fonctionnement cellulaire de tout organisme et permet à la cellule de réagir aux messages de son environnement. Parmi les contaminants potentiels, ceux pouvant interagir directement ou indirectement avec le matériel génétique présentent un intérêt d'étude particulier car ils peuvent interférer avec l'ensemble du métabolisme cellulaire et conduire à la transmission d'informations erronées. La définition de la génotoxicité établie par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC, 1992) inclut à la fois des effets directs et indirects sur

l'ADN tels qu'une induction de modifications géniques, chromosomiques, génomiques, d'événements indirectement associés à la mutagenèse (synthèse non programmée de l'ADN ou échange de chromatides sœurs), des modifications de la structure primaire de l'ADN (cassures, adduits) pouvant conduire à des mutations. Ces modifications peuvent en théorie affecter plusieurs niveaux d'organisation biologique, de la molécule à la population en modifiant des fonctions telles que le développement, la reproduction et la survie des individus et ainsi compromettre la dynamique de croissance des populations (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003).

Par définition, les produits génotoxiques sont donc des agents physiques ou chimiques capable d'induire des modifications génétiques dans les cellules vivantes. Divers agents chimiques (organiques et inorganiques) et physiques (radiations ionisantes, rayonnements UV) ont la capacité d'interagir avec la molécule d'ADN et d'en modifier l'intégrité. La taille de la cible affectée varie selon le mode d'action des agents génotoxiques. Les dommages à l'ADN sont généralement partagés en deux catégories : les lésions géniques (lésions fonctionnelles) et les lésions chromosomiques (lésions structurales).

3.1.1. Les lésions géniques

Elles résultent d'une modification de la séquence nucléotidique des régions codantes (mutations fonctionnelles) et/ou non codantes (mutations silencieuses) d'un gène. Ces mutations ponctuelles peuvent être provoquées par des agents mutagènes et consistent essentiellement en des substitutions, additions ou délétions de paires de bases. Selon leur positionnement sur la séquence nucléotidique (au niveau des codons stop par exemple) elles peuvent affecter l'expression du gène et conduire à des nouveaux produits de synthèse plus ou moins défectueux. Les mutations produisant un décalage du cadre de lecture du code génétique «frameshift mutations» modifient quant à elles la séquence du gène, altèrent sa transcription et mènent fréquemment à des produits de gènes non fonctionnels.

3.1.2. Les lésions chromosomiques

Elles peuvent être caractérisées soit par l'altération du nombre de chromosomes qui conduit à des aneuploïdies ou des polyploïdies, généralement induites par une exposition à des substances interférant avec l'appareil mitotique durant la division cellulaire, soit par l'altération de la structure des chromosomes avec des cassures, des délétions, des inversions

ou des translocations. On parle alors non plus d'agents mutagènes mais plutôt d'agents clastogènes pour les produits responsables de ces lésions chromosomiques. Certaines de ces modifications structurales comme les adduits à l'ADN ou la dimérisation de bases pyrimidiques sont spécifiques de l'agent génotoxique responsable (Shugart, 2000).

Les mécanismes menant à ces différentes lésions structurales varient selon les agents génotoxiques. Certaines de ces lésions proviennent d'interactions directes du xénobiotique avec la molécule d'ADN, aussi bien sous sa forme d'origine ou après sa biotransformation en métabolites réactifs. D'autres sont indirectes, comme les dommages oxydants, et proviennent également d'effets secondaires de certains agents génotoxiques capables de générer des éléments oxygénés actifs. L'altération la plus connue est l'oxydation de la guanine en 8-hydroxyguanine (8-oxo-dG) par les deux formes réactives les plus génotoxiques : le radical hydroxyle et l'oxygène singulet.

Lorsque les dommages persistent sans provoquer la mort cellulaire, ils peuvent altérer la fidélité de la réplication et produire des mutations irréversibles capables de se propager dans les cellules filles. Les échanges de chromatides sœurs, les aberrations chromosomiques structurales (délétions, duplications, recombinaisons, translocations) et numériques (aneuploïdie, polyploïdie), la formation de micronoyaux sont les principaux dommages cytogénétiques formés au cours ou suite à la division cellulaire après une exposition à des génotoxiques (Hebert et Luiker, 1996).

3.2. Les tests génotoxicologiques.

Un bon test toxicologique doit respecter la règle des 5R (en anglais) (Callow et Forbes, 2003):

-Relevance : Réalisme, pertinence, représentativité. Le modèle choisi pour le test doit être représentatif du milieu évalué.

-Reliability : Fiabilité. Une méthode fiable peut être utilisée à n'importe quel moment et dans la plupart des conditions.

-Repeatability : Répétabilité. Les résultats qui sont obtenus après plusieurs répétitions ne doivent pas ou peu varier.

-Reproducibility : Reproductibilité. Les mêmes résultats doivent être retrouvés auprès d'expérimentateurs différents à différents endroits.

-Robustness : Robustesse. La méthode peut être effectuée quelque soit l'environnement expérimental ou le niveau technique de l'expérimentateur.

Plusieurs tests génotoxiques sont décrits dans la littérature. Ils possèdent tous des points forts et des points faibles qui sont décrits ci-après.

3.2.1. Le test d'Ames.

Le test d'Ames est l'une des premières méthodes pour identifier un produit génotoxique. Il utilise des bactéries pour vérifier si un produit chimique peut provoquer des mutations dans l'ADN et évaluer son potentiel mutagène. Un test positif indique que le produit chimique est un agent potentiellement cancérigène. Ce test est rapide, pratique et peu coûteux.

Le test consiste à incuber dans un milieu complet (contenant notamment de l'histidine) une souche de *Salmonella typhimurium* en présence de la molécule chimique à tester. Cette souche de salmonelle est auxotrophique pour l'histidine, c'est-à-dire qu'elle possède un gène *histidine* muté ne permettant pas de produire une enzyme nécessaire à la synthèse de cet acide aminé essentiel. Après plusieurs temps de génération d'incubation, afin de laisser s'exprimer les mutations éventuelles, le microorganisme est transféré sur un milieu ne contenant pas d'histidine. La bactérie ne peut pas se développer, sauf si son gène *histidine* a subi une nouvelle mutation (provoquée par la molécule testée) pour retrouver sa fonctionnalité, c'est une réversion génique. Dans ce cas la bactérie redevient prototrophe et peut se multiplier sur un milieu minimum, la molécule testée est alors considérée comme mutagène (figure 5).

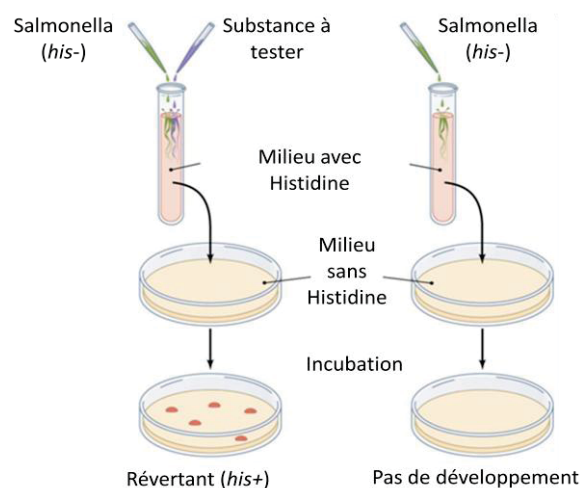


Figure 5 : Déroulement d'un test d'Ames. Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings avec modifications

La faiblesse du test d'Ames est l'utilisation d'un procaryote, *Salmonella typhimurium*, ce n'est donc un bon modèle pour évaluer les risques potentiels chez les humains. De plus des faux positifs ou négatifs sont souvent observés (Khandoudi *et al.*, 2009; Kitchin *et al.*, 1993).

3.2.2. Détection des adduits 8-oxo-dG.

Les molécules oxydantes, le rayonnement ou encore certaines toxines peuvent endommager les acides nucléiques et générer des lésions qui peuvent contribuer à l'apparition de cancer. Ces lésions sont généralement caractérisées par l'apparition d'adduits de l'ADN, et près de 20 adduits de l'ADN ont été identifiés après oxydation. L'un de ces adduits est le 8-oxo-2'-désoxyguanosine (8-oxo-dG) (Luo *et al.*, 1996). Le 8-oxo-dG et sa base associée, la 8-oxo-guanine, se sont révélés particulièrement utiles pour déterminer le niveau d'oxydation de l'ADN en raison de la sélectivité et de la sensibilité avec laquelle ils peuvent être quantifiés. Des chromatographies en phase liquide sont habituellement utilisées pour quantifier les 8-oxo-dG (figure 6), mais l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques au 8-oxo-dG permet d'augmenter la sensibilité de détection de cet adduit, notamment à partir d'échantillons d'urine, de sang, et de milieu de culture de tissu par l'intermédiaire de techniques immunologiques (Helbock *et al.*, 1998).

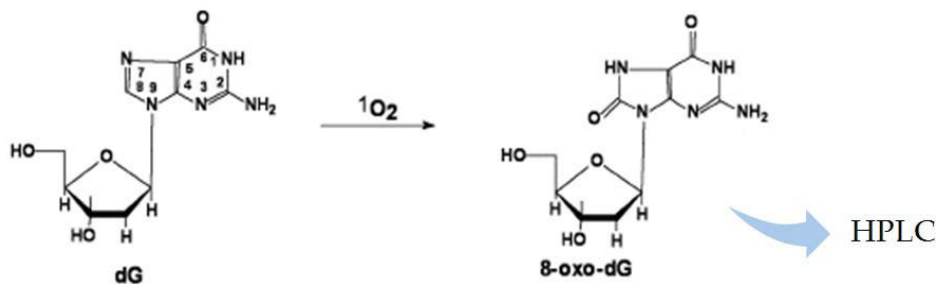


Figure 6 : Oxydation d'une guanine et formation d'un adduit 8-oxo-dG. D'après Garry R. Buettner University of Iowa, avec modifications.

3.2.3. Le test comète.

Le test Comète est une méthode rapide, sensible et relativement simple pour détecter des lésions de l'ADN au niveau de cellules individuelles (Singh *et al.*, 1988). Il est fondé sur des analyses biochimiques pour détecter des cassures de l'ADN.

Ce test fut d'abord utilisé en 1984 à pH neutre. La coloration était réalisée à l'acridine orange et l'image obtenue ressemblait à une "comète" avec une tête distincte, comprenant de l'ADN intact et une queue, constituée de fragments endommagés (Ostling et Johanson, 1984) (figure 7).

Une méthode alcaline du test des comètes a été développée en 1988 (Singh *et al.*, 1988). Cette méthode permet de mesurer de faibles quantités de cassure de l'ADN avec une grande sensibilité pour des études génotoxicologique et écotoxicologiques (Collins *et al.*, 2008; Lah *et al.*, 2005; Maluszynska et Juchimiuk, 2005). Le test est généralement réalisé à partir d'un échantillon sanguin, mais il est également possible avec des cellules végétales (Bandyopadhyay et Mukherjee, 2011; Koppen et Verschaeve, 1996; Navarrete *et al.*, 1997).

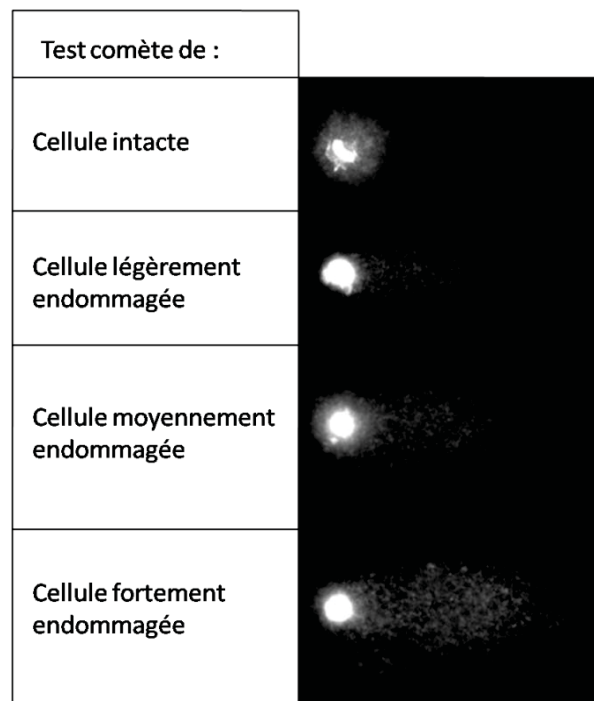


Figure 7 : Test comète sur des cellules dont les chromosomes ont subi différents niveaux de cassures. D'après Cortés-Gutiérrez et al., 2011 avec modifications.

Le test comète a plusieurs avantages :

- L'acquisition des données est faite au niveau de la cellule individuelle et cela permet des analyses statistiques plus robustes.
- La technique peut être réalisée sur un petit nombre de cellules par échantillon.
- La détection des dommages de l'ADN est très sensible et elle peut être quantitative si le type de révélation/coloration de l'ADN est adapté (il est nécessaire dans ce cas que l'intensité de la révélation soit proportionnelle à la quantité d'ADN). La quantification passe par le calcul de certains paramètres comme le pourcentage d'ADN présent dans la queue de la comète et « l'Olive Tail Moment » qui est défini par le produit de la quantité d'ADN dans la queue et la distance moyenne de migration.
- Cette technique peut être réalisée sur un grand panel de cellules eucaryotes que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, à partir d'organismes aquatiques, d'échantillons provenant d'animaux, de végétaux ou de populations humaines (Collins *et al.*, 2008; Koppen et Verschaeve, 1996; Navarrete *et al.*, 1997).

Ce test est de plus en plus utilisé et remplace certains tests traditionnels pour des études génotoxiques réglementaires (Burlinson *et al.*, 2007; Tice *et al.*, 2000). Le test de comète peut aussi être réalisé en combinaison avec certaines enzymes bactériennes (par exemple l'endonucléase III, l'uracile glycosylase, etc.), qui reconnaissent des purines ou des bases pyrimidiques oxydées. Ainsi il est possible de déterminer et doser les dommages oxydants de l'ADN provoqués par le xénobiotique (Kruman *et al.*, 2002). Ce test a également été utilisé pour montrer des effets protecteurs de différents aliments comme les fruits riches en vitamines pour leur rôle antioxydant, ou encore le café qui stimule l'activité d'enzymes protégeant l'intégrité du génome (Bichler *et al.*, 2007).

Le test de comète peut être effectué en combinaison avec la technique de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (Comète-FISH) pour visualiser des événements se déroulant au niveau de certaines séquences spécifiques (Santos *et al.*, 1997). Ce test permet l'analyse simultanée et comparative des dommages de l'ADN et leurs réparations dans des régions chromosomiques définies. Cette technique est utilisée pour la détection des cassures ADN en des sites spécifiques qui témoignent du développement de certaines maladies. Cette approche très sensible peut être appliquée à un grand nombre de lésions, comme celles induites par des produits carcinogènes ou par certains rayonnements (Glei *et al.*, 2009).

3.2.4. Le test TUNEL

L'évaluation de la génotoxicité peut être effectuée par la technique TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling). Ce test est fondé sur l'étiquetage des brins d'ADN qui ont subi une cassure et permet la détection des cassures de l'ADN dans un seul noyau. Ce test est généralement utilisé pour observer les cellules subissant un phénomène d'apoptose (mort cellulaire programmée) mais peut être étendu à la détection de cassures de l'ADN provoquées par des produits génotoxiques (Maluszynska et Juchimiuk, 2005).

Le test TUNEL est fondé sur l'incorporation de dUTP modifié, grâce à l'enzyme désoxynucléotidyle transférase (TdT), à leur extrémité 3'OH de l'ADN fragmenté. La TdT permet de synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir d'une extrémité 3'OH. Le dUTP modifié peut posséder un fluorophore, ou une biotine (pour une détection par l'intermédiaire d'un anticorps) pour une observation au microscope à fluorescence (figure 8). Ainsi ce test permet de détecter les cassures de l'ADN au sein d'un tissu. Ce test, très

sensible, ne permet pas de quantifier les lésions de l'ADN mais donne une indication sur la localisation des cellules les plus touchées par un traitement génotoxique.

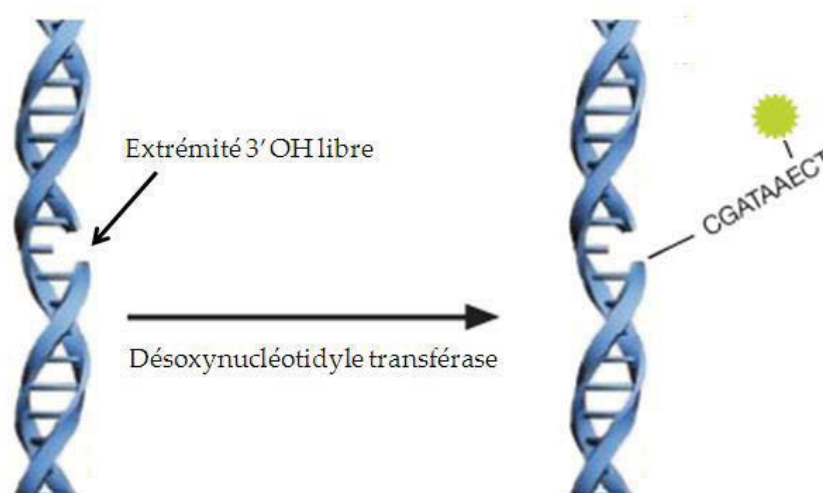


Figure 8 : Détection d'une cassure chromosomique avec la technique de TUNEL. D'après Life TechnologiesTM Protocols avec modification.

3.2.5. Le test d'aberrations chromosomiques

Le test d'aberrations chromosomiques *in vitro* peut être pratiqué chez les plantes sur les cellules somatiques au niveau de la zone méristématique des extrémités racinaire (Ji *et al.*, 1999; Marcano *et al.*, 2002; Steinkellner *et al.*, 1998) ou sur les cellules germinales sur de jeunes bourgeons floraux (Ma *et al.*, 1996). Ce test est destiné à détecter les agents polluants qui provoquent des anomalies touchant la structure des chromosomes.

Ces aberrations sont détectables par un examen au microscope optique ou par fluorescence. Cet examen peut être réalisé sur les cellules aux stades anaphase et télophase (Rank et Nielsen, 1997) et se présentent sous la forme de délétions, de cassures ou de modifications chromosomiques observables. Ces modifications structurales des chromosomes sont soit induites directement par l'agent polluant en créant des dommages au niveau de l'ADN, soit indirectement suite à la production d'espèces réactives de l'oxygène par exemple qui vont former des adduits de l'ADN (Kovalchuk *et al.*, 2001). Selon la littérature les aberrations structurales sont sous forme de chromosomes « vagabonds », d'adhérences de chromosomes ou « stickiness », de ponts chromosomiques, de chromosomes isolés (absence de migration des chromosomes), de chromosomes

fragmentés et de formes atypiques de migration telle que les chromosomes en étoile (figures 13 et 14).

Les délétions terminales ou les pertes de télomères ont comme conséquence la formation de ponts et de chromosomes fragmentés en ana-télophase (Nicoloff et Gecheff, 1976; Rank et Nielsen, 1993). En effet, quand un chromosome se coupe en un point unique, les fragments distaux, c'est à dire les fragments qui sont détachés du centromère, ou acentriques et donc ne possédant pas de centromère, sont perdus. Bien que le grand fragment restant contienne le centromère, l'absence de télomère fonctionnel à l'une des extrémités conduit fréquemment à l'instabilité du chromosome. Il se forme alors un pont chromosomique et, s'il est assez long, un fragment peut être visible (Rank, 2003) (figure 9).

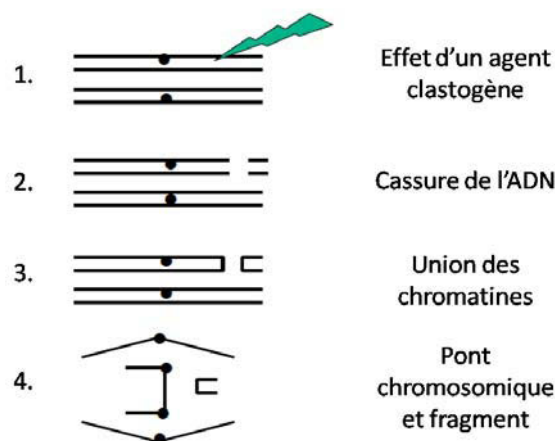


Figure 9 : Formation d'un pont chromosomique et d'un fragment durant l'anaphase ou la télophase après cassure double brin de la chromatine et de sa « mauvaise » réparation. D'après Rank, 2003 avec modifications (Rank, 2003).

Les adhérences de chromosomes ou "stickiness" sont définies comme étant des agglutinations de chromosomes de nature inconnue qui ont comme conséquence un aspect collant (Jiang *et al.*, 2000). Ces adhérences sont supposées apparaître lors de la perte d'activité de certaines protéines telles que l'ADN-topoisomérase-II, ce qui peut également être à l'origine des cassures chromosomiques (Gaulden, 1987). En effet, la topoisomérase-II joue un rôle dans la condensation des chromosomes pendant la prophase ainsi que la séparation des deux chromatides sœurs pendant l'anaphase.

Les chromosomes vagabonds, isolés ou les anaphases de type « étoile » peuvent être issus d'une désorganisation du réseau des microtubules. En début d'anaphase, les chromatides sœurs se séparent de façon synchrone et les deux lots sont "tirés" par les microtubules kinetochoriens vers les pôles. Si les microtubules ne sont plus fonctionnels et ne permettent plus la bonne migration des chromosomes, il en résulte des anaphases et télophases aberrantes (Eleftheriou *et al.*, 2012).

Les « c-mitosis » ou « colchicine-mitosis », ont été observées pour la première fois chez les animaux après traitement par la colchicine. La colchicine inhibe la polymérisation des microtubules en se liant à la tubuline. Cet effet, éventuellement réversible, peut induire la ploïdie et des cas d'aneuploïdie (le nombre de chromosomes n'est pas respecté) (Fiskesjö, 1985; Liman *et al.*, 2010). Les effets toxiques de la colchicine favorisent l'arrêt de la division cellulaire au stade de la pro-métaphase et les chromosomes continuent à se condenser, montrant ainsi une longueur réduite (Rodríguez *et al.*, 2001). L'ajout de la colchicine permet notamment l'étude des caryotypes.

3.3. Les modèles végétaux

La plupart des tests de toxicité sont effectués sur des petits mammifères tels que les rats ou les souris ce qui est relativement long, coûteux et critiquable d'un point de vue éthique (Tsuda *et al.*, 2001). L'utilisation des plantes comme modèle expérimental pour évaluer la toxicité est relativement attrayante puisque ces tests sont relativement simples à réaliser, peu coûteux, sensibles, et rapides.

Certains auteurs soulignent l'importance de l'utilisation des plantes comme modèles biologiques pour l'évaluation et la détection de produits à risque dans l'environnement (Gopalan, 1999; Ma, 1999). Les plantes seraient plus sensibles que les autres organismes pour détecter des éléments clastogènes et permettent des études sur la pollution au niveau des sols, au niveau aquatique ou atmosphérique. Le test de germination ou de croissance racinaire est largement utilisé pour déterminer la toxicité des herbicides, des métaux lourds, des stress salins ainsi que des produits chimiques toxiques (Dane et Dalgic, 2005; Hidalgo *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 2000; Liman *et al.*, 2011).

Les modèles végétaux utilisés dans les tests de génotoxicité sont le plus souvent *Allium cepa*, *Tradescantia* et *Vicia faba*. Ces espèces ont pour avantage d'être utilisables à la

fois pour des tests de toxicité et/ou des tests de génotoxicité. En effet ces espèces possèdent un nombre réduit de chromosomes qui sont de taille conséquente. Cela permet des observations microscopiques plus faciles et plus précises lors de la recherche d'anomalie structurale au cours de la mitose (Grant, 1994).

Allium cepa ($2n = 16$) est une plante de la famille des *Amaryllidaceae* cultivée dans de nombreux pays pour un usage alimentaire. Son caryotype présente 8 paires de chromosomes de 8 à 16 μm (Grant, 1982). Il existe plusieurs variétés d'oignons pouvant être utilisés dans des tests de toxicité (Ma *et al.*, 1995a). Durant nos expérimentations nous avons utilisé la variété *aggregatum* plus communément appelé échalote. Cette variété a pour avantage d'avoir un bulbe plus petit que celui de l'oignon classique et possède des racines plus fines et donc plus simples à manipuler car elles permettent un étalement plus homogène sur la lame de verre avant l'observation microscopique.

Allium cepa est un modèle qui permet l'évaluation de la toxicité grâce à l'évaluation de l'élongation racinaire, de l'indice mitotique et de la germination. D'un point de vue génotoxique cette espèce permet d'évaluer la fréquence des micronoyaux, des anomalies chromosomiques dans les extrémités racinaires et d'effectuer des tests comète avec le protocole approprié (Bandyopadhyay et Mukherjee, 2011; Dane et Dalgic, 2005; Hidalgo *et al.*, 1989; Tedesco *et al.*, 2003).

Matériels et méthodes

1. Etude génotoxique et élongation racinaire

1.1. Traitements et prélèvements

1.1.1. Allium cepa

Les bulbes d'*Allium cepa* L. var. *aggregatum* ont été obtenus auprès d'un même fournisseur afin de garantir une constance dans l'approvisionnement. Ces échalotes rose de la variété « ronde de Jersey » de calibre 24-44 de classe 1 sont cultivées de manière traditionnelle en Bretagne. La culture traditionnelle permet une reproduction végétative donnant au spécimen étudié un fond génétique stable. De plus la culture est biologique, permettant l'obtention de bulbes exempts de produits phytopharmaceutiques qui pourraient introduire un biais lors de nos études. Dans un premier temps, des bulbes de diamètres équivalents sont choisis, nettoyés et rincés. Les anciennes racines sont enlevées ainsi que la première pelure. La base du bulbe est légèrement coupée pour permettre aux futures racines de croître. Le bulbe est alors mis en culture hydroponique dans un tube de 40mL contenant de l'eau distillée. Le plateau du bulbe doit être en contact avec le liquide. La culture se réalise à l'obscurité et à température ambiante. La culture dure entre 48 et 72h pour obtenir de jeunes racines mesurant de 2 à 3 cm (figure 10).

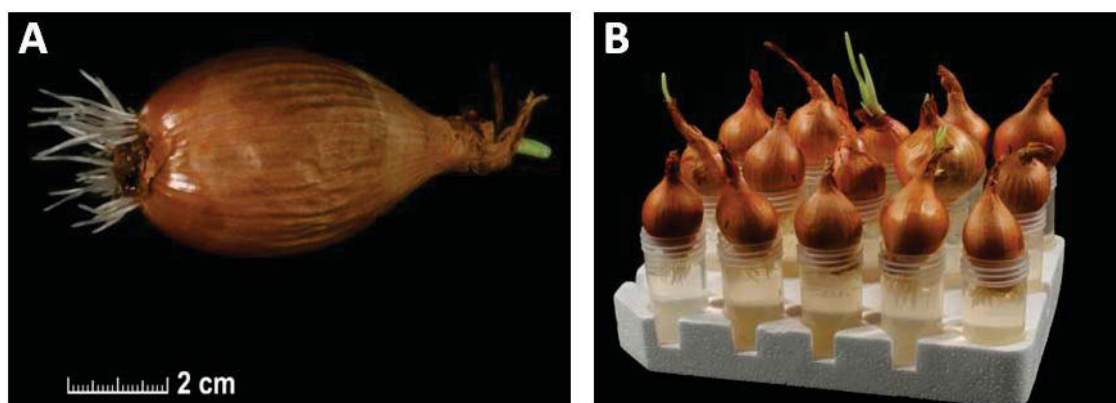


Figure 10 : Photographies d'Allium cepa. La photographie A est un bulbe d'Allium cepa et son système racinaire après 48h de culture. La photographie B montre le dispositif expérimental de la culture hydroponique d'Allium cepa.

Lorsque les racines ont atteint la taille recherchée, les bulbes sont annotés puis les racines sont photographiées à l'aide d'un appareil de la marque CANON, modèle EOS 1100D, muni d'un objectif Canon Macro EF-S 60mm pour la mesure de croissance. Les bulbes sont

ensuite remis en culture en présence des solutions à tester pendant 48h. Une deuxième série de photographie est réalisée à la fin du traitement. Les bulbes sont ensuite rincés et les extrémités racinaires sont récoltées dans une solution Clarke (éthanol 96% et acide acétique glacial 3 : 1) pendant 24h à 4°C pour fixer les acides nucléiques. Pour un stockage plus long, les racines sont ensuite mises dans une solution d'éthanol 70% et stockées à 4°C.

1.1.2. Autres modèles étudiés.

Plusieurs autres modèles végétaux ont aussi été utilisés pour caractériser l'effet du 1,9-dione-3,4-dihydro-6-méthylsulfonyl xanthène (XDD).

Trois autres variétés de plante à bulbe ont été utilisées durant nos expérimentations. *Habranthus robustus*, *Iris hollandica* et *Gladiolus grandiflorus* ont été sélectionnées. Les bulbes ont été choisis de tailles homogènes puis placés dans des tubes en verre suffisamment gros pour que le plateau touche la surface de l'eau. Ils ont subi une phase de préculture dans l'eau distillée de 96h à l'obscurité, à 23°C. Ils ont ensuite été traités pour une durée de 48h à l'obscurité et à 23°C.

Les tests de croissance racinaire ont été également réalisés avec *Zea mays*. Cette espèce a été sélectionnée pour nos études car c'est une plante à fort intérêt agronomique qui est largement soumise aux traitements phytosanitaires, particulièrement la sulcotrione qui est utilisée comme herbicide lors de la culture de cette espèce. Les grains de maïs sont mis en culture dans un milieu contenant de la vermiculite. Lorsque les plants ont atteint un stade de développement de 3 feuilles, les plantules sont délicatement transférées en hydroponie dans des tubes de 15mL contenant la solution à tester et un milieu nutritif durant 14 jours avec une photopériode de 18h de jour et 6h de nuit, à 23°C.

Le modèle *Arabidopsis thaliana* a également été utilisé dans notre étude de la croissance racinaire. *Arabidopsis thaliana* est une dicotylédone facile à cultiver dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Murashige et Skoog. Des graines sont stérilisées à l'éthanol 70% puis placées dans la gélose. Les graines sont disposées en ligne à 1 cm d'intervalle, à raison de six graines par boîte. Les différents traitements chimiques sont introduits dans le milieu de culture gélosé. Trois boîtes par traitement ont été réalisées. Elles ont été placées 72h à 4°C afin de synchroniser la germination des graines. Elles sont ensuite

déposées à la verticale afin de favoriser la croissance selon un sens précis, en chambre de culture, à 23°C, avec une photopériode correspondant à 18h de jour et 6h de nuit.

1.2. Croissance racinaire

Pour calculer la croissance racinaire, les bulbes mis en culture avec les divers traitements sont photographiés avant les traitements et 48h après. Pour chaque bulbe, au minimum dix racines choisies aléatoirement ont été mesurées à l'aide du logiciel « Image J ». Ce sont les mêmes racines qui sont mesurées avant et après traitement, permettant de déterminer un delta de croissance (figure 11). La croissance racinaire est obtenue en utilisant la formule suivante :

Croissance racinaire = longueur à t_{48h} – longueur à t_{0h}

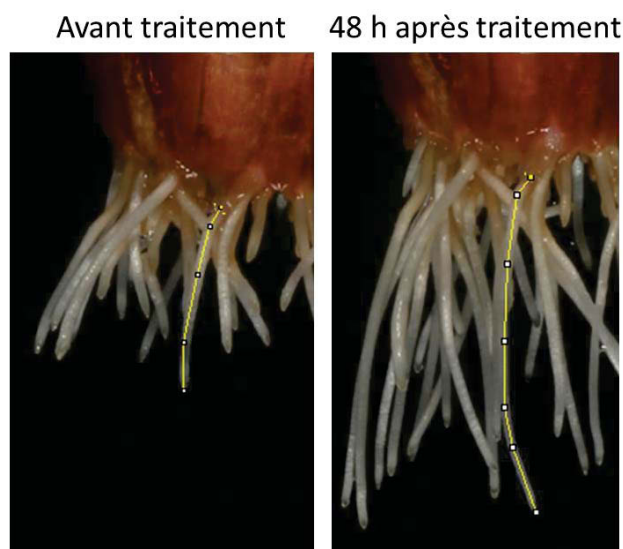


Figure 11 : Photographies du système racinaire d'un bulbe d'Allium cepa avant et après traitement pendant 48h. Les mesures de croissance racinaire sont réalisées avec l'utilisation du logiciel « ImageJ », chaque mesure est réalisée en suivant la racine (trait jaune).

1.3. Coloration des extrémités racinaires

Les extrémités racinaires contenues dans la solution de stockage (éthanol 70%) sont rincées une fois dans de l'eau distillée pendant 10min. Les racines subissent ensuite une légère hydrolyse pour fragiliser les parois et permettre un meilleur étalement pour l'observation microscopique. L'hydrolyse est réalisée dans une solution de HCL 1N pendant 5 minutes puis les racines sont rincées avec de l'eau distillée. La coloration est faite à l'orcéine

acétique 1% durant une heure minimum. L'orcéine n'est pas un colorant spécifique de la chromatine, mais en solution acide (d'où l'importance de l'acide acétique) c'est un colorant basique qui va avoir une affinité avec les chromosomes basophiles et les colorer en rouge. Cette dernière étape est réalisée dans un tube 2mL sur toutes les racines issues d'un même bulbe. Suite à la coloration, seule la zone méristématique sera observée en microscopie après avoir écarté la coiffe et étalé les cellules méristématiques entre lame et lamelle dans une goutte d'acide acétique 45%.

1.4. Observation microscopique

Les méristèmes sont observés sous microscope Olympus CX41. Pour chaque bulbe, au minimum 8 racines sont analysées au microscope pour déterminer les deux principaux paramètres : l'indice mitotique et la fréquence des anomalies chromosomiques. Pour cette étude, seuls les méristèmes ayant une coloration de bonne qualité et des cellules bien étalées sont analysés.

1.4.1. Indice mitotique

L'indice mitotique (ou index mitotique) représente le pourcentage de cellules en cours de division à un temps donné. Il évalue les capacités prolifératives par comptage des mitoses à partir d'une préparation tissulaire colorée. Pour calculer ce paramètre un champ d'observation au grossissement x400 est sélectionné dans la zone méristématique pour lequel les cellules sont bien étalées et bien colorées (figure 12). Dans ce champ d'observation ($\approx 0.2\text{mm}^2$), un comptage de toutes les cellules est effectué, puis chaque stade de la mitose est évalué avec présence ou non d'anomalies chromosomiques. En comptabilisant prophase, métaphase anaphase et télophase on obtient un nombre de cellules en division sur une population totale de cellules. L'indice mitotique est obtenu par la relation suivante :

Indice mitotique (%) = nombre de cellules en division / nombre total de cellules x 100

Pour chaque racine, 4 à 5 champs d'observation sont analysés. Les cellules (3000) sont comptabilisées pour chaque bulbe de chaque traitement. Avec une répétition d'au moins 3 bulbes par traitement. Chaque indice mitotique présenté dans notre étude correspond donc à l'examen d'au minimum 9000 cellules méristématiques.

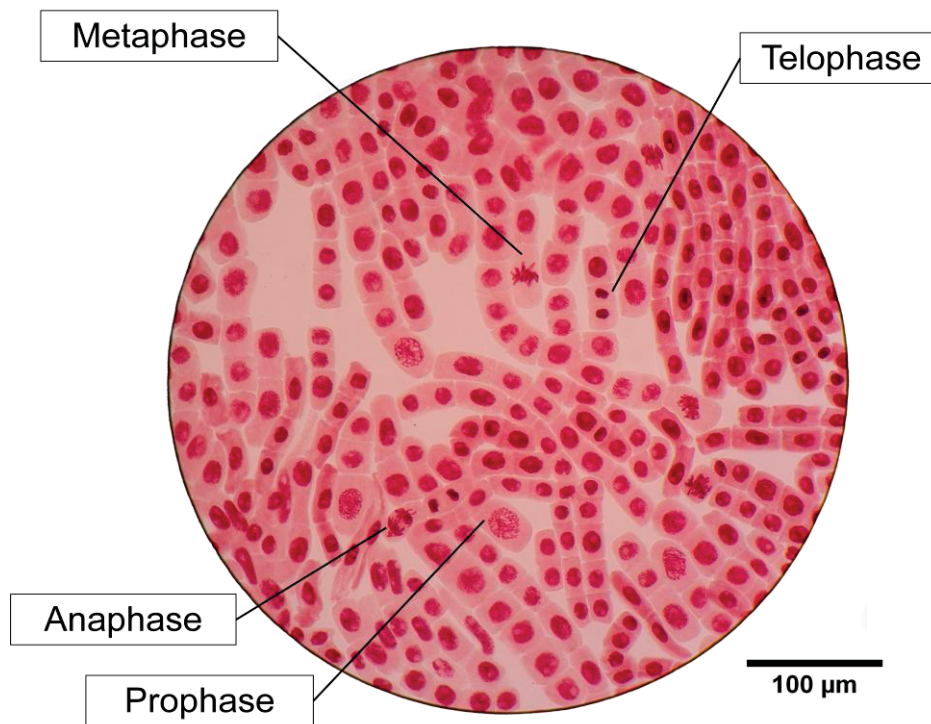


Figure 12 : Champs d'observation au niveau d'un méristème racinaire chez Allium cepa. L'observation est réalisée à un grossissement x400 après coloration à l'orceïne acétique. Les principales étapes de la mitose sont représentées.

1.4.2. Fréquences d'anomalie

Le test d'aberrations chromosomique est pratiqué chez les plantes au niveau de la zone méristématique (Ji *et al.*, 1999; Marcano *et al.*, 2002; Steinkellner *et al.*, 1998). Ce test est destiné à détecter les agents qui provoquent des anomalies touchant la structure des chromosomes.

Pour établir la fréquence des anomalies chromosomiques nous avons choisi de comptabiliser les cellules aberrantes durant les stades anaphase et télophase car ce calcul

est représentatif de l'ensemble des stades mitotiques (Rank et Nielsen, 1997). Pour ce dénombrement, un balayage large est effectué sur toute la zone méristématique étudiée. Chaque anaphase et chaque télophase sont dénombrées puis, si ces figures de mitose sont aberrantes, l'anomalie est identifiée et comptabilisée (figure 13). La fréquence d'anomalie est calculée selon la formule :

$$\text{Fréquence d'anomalie (\%)} = \frac{\text{ana-télophases aberrantes}}{\text{total d'ana-télophases}} \times 100$$

Pour chaque bulbe étudié, au minimum 8 zones méristématiques sont examinées. Le nombre de cellules en anaphase ou en télophase étant variable selon le traitement, un minimum de 100 anaphases/télophases sont attendus chez un bulbe pour réaliser le calcul.

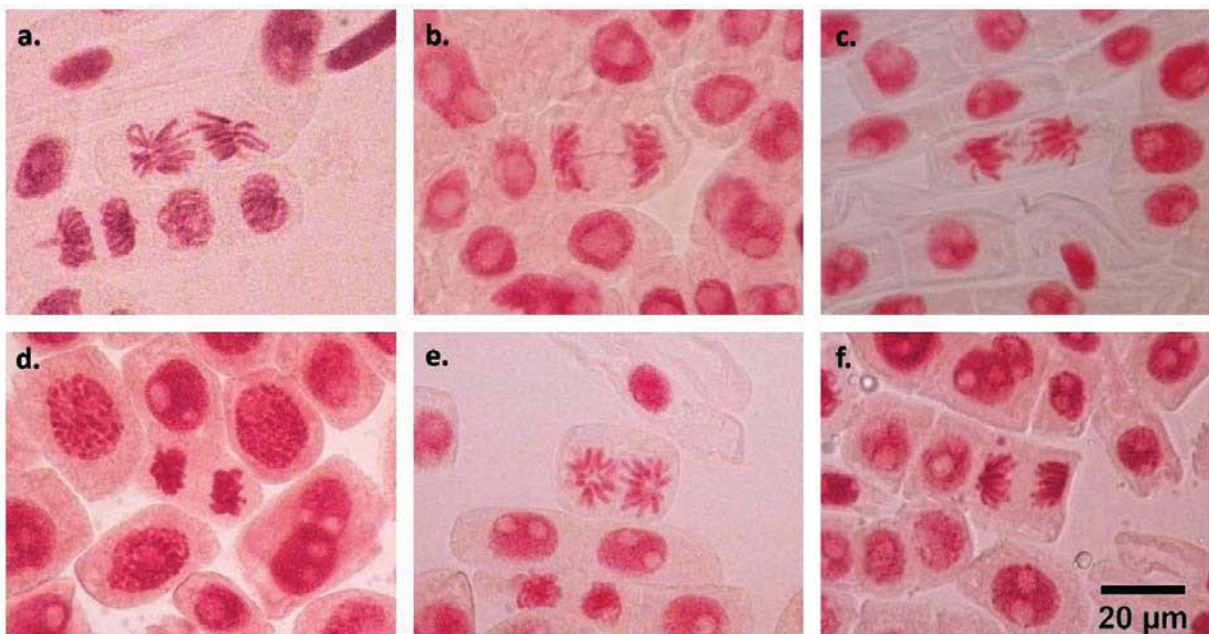


Figure 13 : Anomalies chromosomiques observées au niveau d'un méristème racinaire chez Allium cepa. L'observation est réalisée à un grossissement x400 après coloration à l'orcéine acétique. Les principales anomalies observées sont : des vagabonds (a), des ponts chromosomiques (b), des chromosomes retardés (c), des chromosomes « pâteux » ou « sticky » (d), sous forme d'étoiles (stars) (e), où lorsque des fragments de chromosome sont observés (f).

1.4.3. Micronoyaux et « c-mitosis ».

Les micronoyaux et des « c-mitosis » (figure 14) sont comptabilisés dans l'ensemble du méristème. Ces aberrations ne sont pas observables durant les étapes d'anaphase ou de télophase. Les micronoyaux sont présents durant l'interphase et les « c-mitosis » correspondent à une étape de prophase/métaphase. Pour évaluer ces deux types d'anomalies, le dénombrement est réalisé en même temps que celui de l'indice mitotique. Le pourcentage de micronoyaux et de « c-mitosis » est donc réalisé sur une population de cellules totales. Leurs fréquences d'apparition ne peuvent pas se comparer à celles des fréquences d'anomalies d'ana-télophase.



Figure 14 : micronoyaux et « c-mitosis » observés au niveau d'un méristème racinaire chez Allium cepa. L'observation des micronoyaux (a) et des « c-mitosis » (b) est réalisée à un grossissement x400 après coloration à l'orcéine acétique.

2. Etude de la photo-transformation de la sulcotrione

2.1. La sulcotrione

La sulcotrione (2-(2-chloro-(4-methylsulfonyl)benzoyl)-1,3-cyclohexanedione) (figure 15) est un produit Pestanal® procuré auprès de Riedel de Haën, Saint-Quentin Fallavier, France. La sulcotrione ($M=328.77 \text{ g.mol}^{-1}$) a un pKa de 3,13. Sa température d'ébullition est de 574.5°C à 760 mmHg. La solubilité de la sulcotrione dans l'eau dépend fortement du pH de la solution : 1670 mg/L à 20°C et pH = 4.8 ; et 130 mg/L à 20°C et pH = 3.6. Son spectre d'absorption est représenté dans la figure 16.

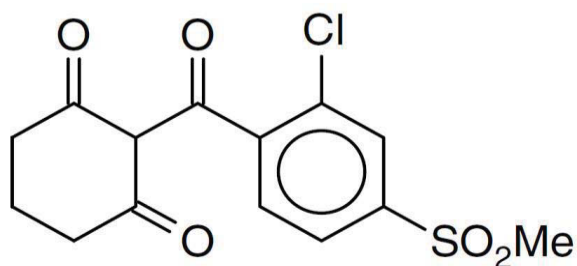


Figure 15 : Formule développée de la sulcotrione.

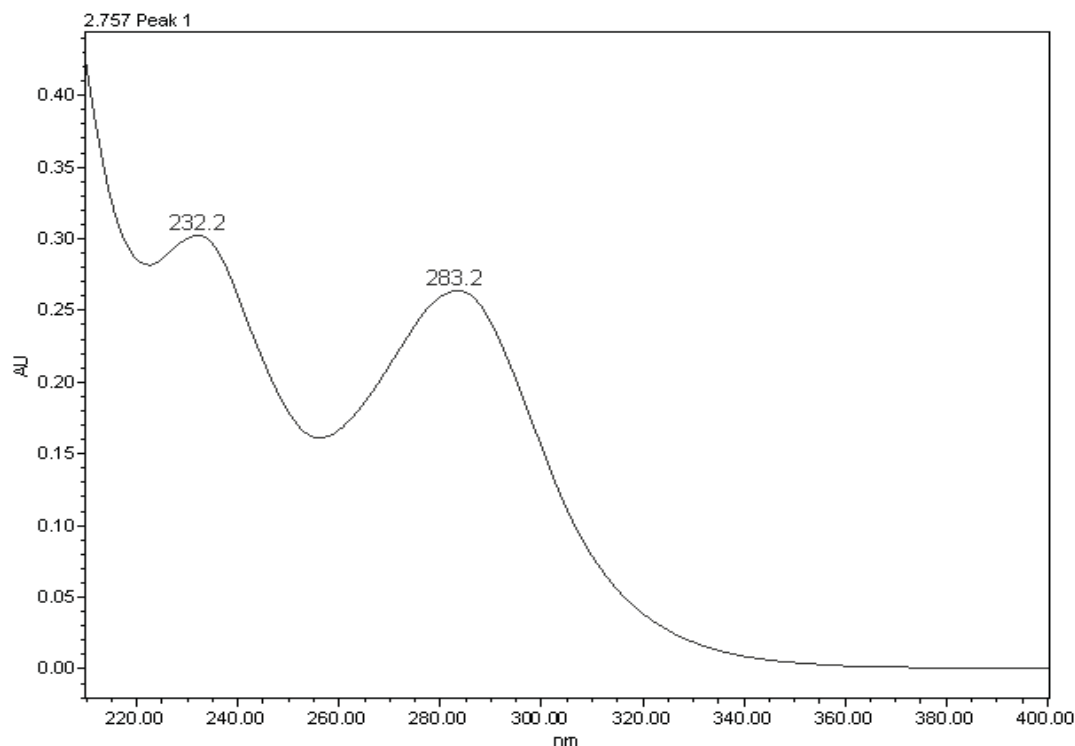


Figure 16 : Spectre d'absorption de la sulcotrione en solution aqueuse pH 2.

2.1.1. Enceintes d'irradiations

Deux types d'enceintes d'irradiation ont été utilisés :

- Afin de préparer des solutions irradiées de sulcotrione à différents taux de conversion, des solutions aqueuses ont été irradiées dans un simulateur solaire Suntest® CPS (Atlas) équipé d'une lampe à arc xénon et de filtres supprimant les radiations lumineuses de longueurs d'onde inférieures à 290 nm et les infrarouges. C'est la source lumineuse dont la distribution spectrale est la plus proche du rayonnement solaire (figure 17) (Hirt *et al.*, 1960). La puissance de l'appareil peut être ajustée entre 0 et 765 W/m². Nous avons opté pour une valeur de 500 W/m², correspondant à l'intensité reçue dans les régions tempérées

quand le soleil est au zénith en juin (Zepp et Cline, 1977). L'intérieur du Suntest® est refroidi par un flux d'air constant et le plateau sur lequel reposent les échantillons est maintenu à 15°C par une circulation d'eau assurée par un cryostat. Une plaque de quartz est placée au-dessus des échantillons pour limiter les perturbations dues au flux d'air dans le Suntest® au cours de l'irradiation.

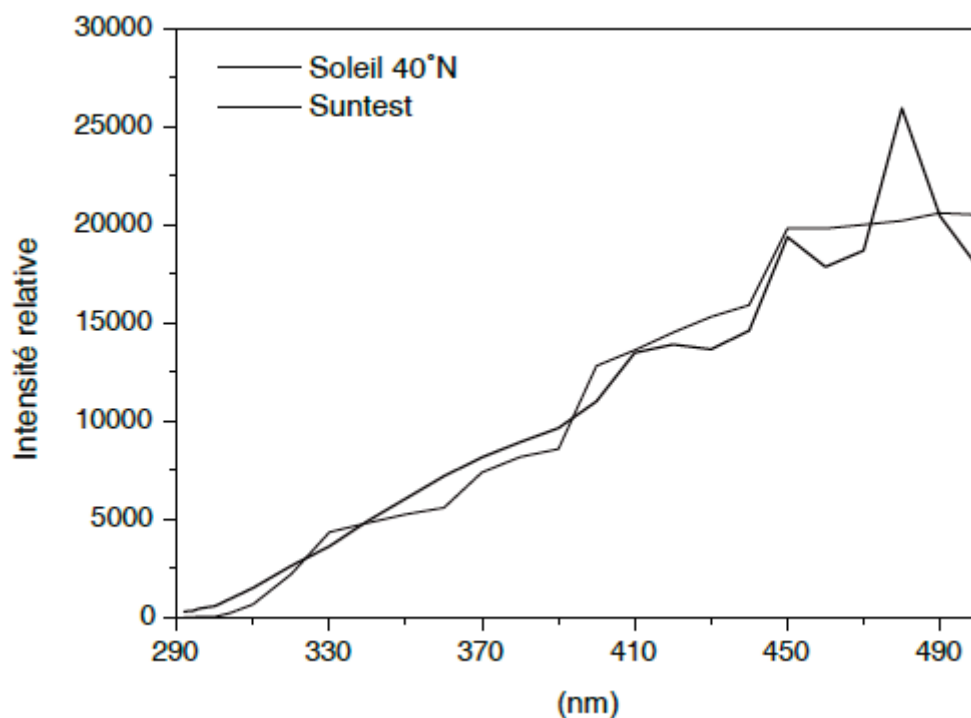


Figure 17 : Distribution spectrale du rayonnement solaire comparé au Suntest

- Afin de synthétiser le 1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl xanthène (XDD) (figure 18), nous avons irradié des solutions de sulcotrione dans de l'acétonitrile à l'aide d'un équipement d'irradiation muni de six tubes fluorescents (TLAD 15W05 Philips, Eindhoven, The Netherlands) qui émettent entre 290 et 450nm.

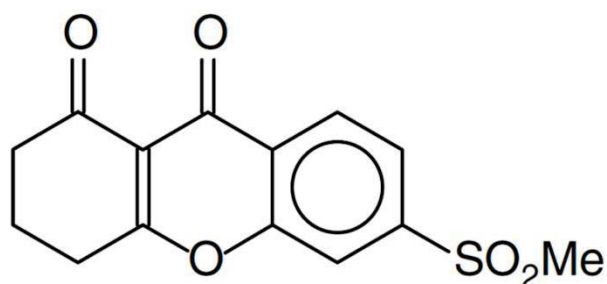


Figure 18: Formule développée du 1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl xanthène (XDD)

2.2. Solutions irradiées de sulcotrione

Une solution de 100mL de sulcotrione 2.10^{-4} M est irradiée soit dans le simulateur Sunset® CPS (Atlas) pour les solutions aqueuses, soit avec l'équipement d'irradiation muni de six tubes fluorescent pour les solutions d'acétonitrile. Les solutions de sulcotrione sont ajustées à pH 2 pour accélérer la réaction de phototransformation. Des échantillons de 1ml sont prélevés tout au long de l'irradiation pour un suivi par HPLC de la consommation en sulcotrione.

2.3. Production de XDD

La production de XDD est réalisée à partir de 60 mg de sulcotrione dans 100mL d'une solution d'acétonitrile qui est irradiée jusqu'à la disparition complète de la sulcotrione (environ 15h d'irradiation). Nous avons ensuite vérifié la totale dégradation de la sulcotrione par HPLC en vérifiant la pureté de la nouvelle solution de XDD. Le spectre d'absorption de XDD est donné en figure 19 et son spectre de fluorescence obtenu par excitation à 280nm est donné en figure 20.

L'acétonitrile est ensuite éliminé à l'aide d'un rotavapor®. La poudre de XDD est ensuite récupérée pour les futures analyses.

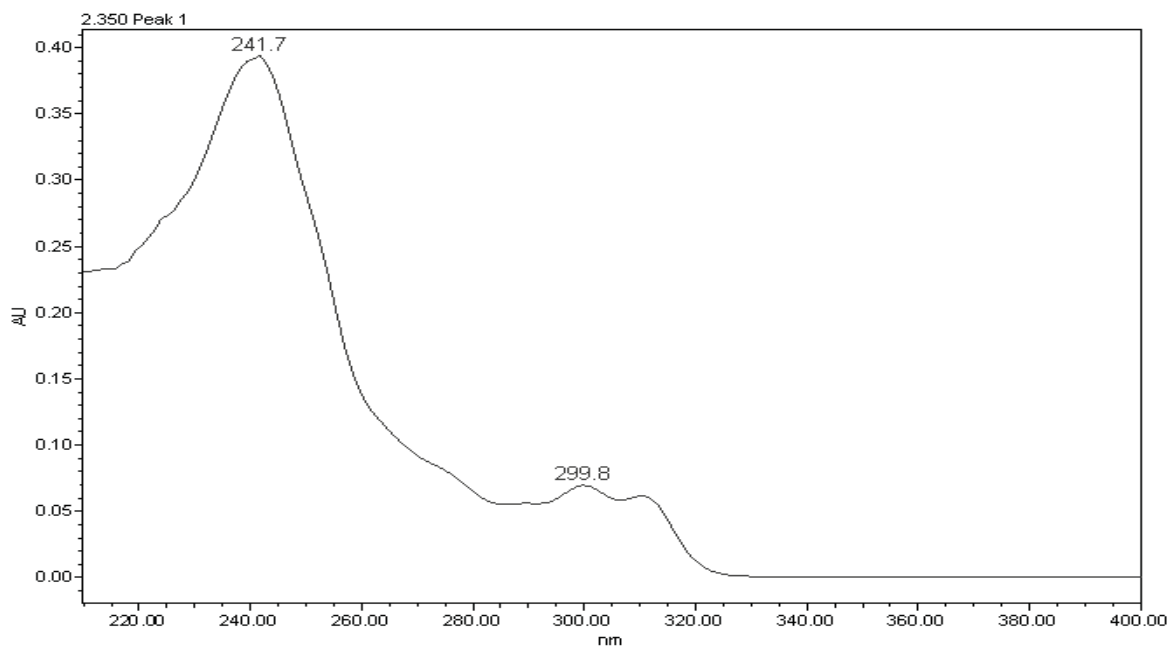


Figure 19 : Spectre d'absorption de XDD en solution d'acétonitrile.

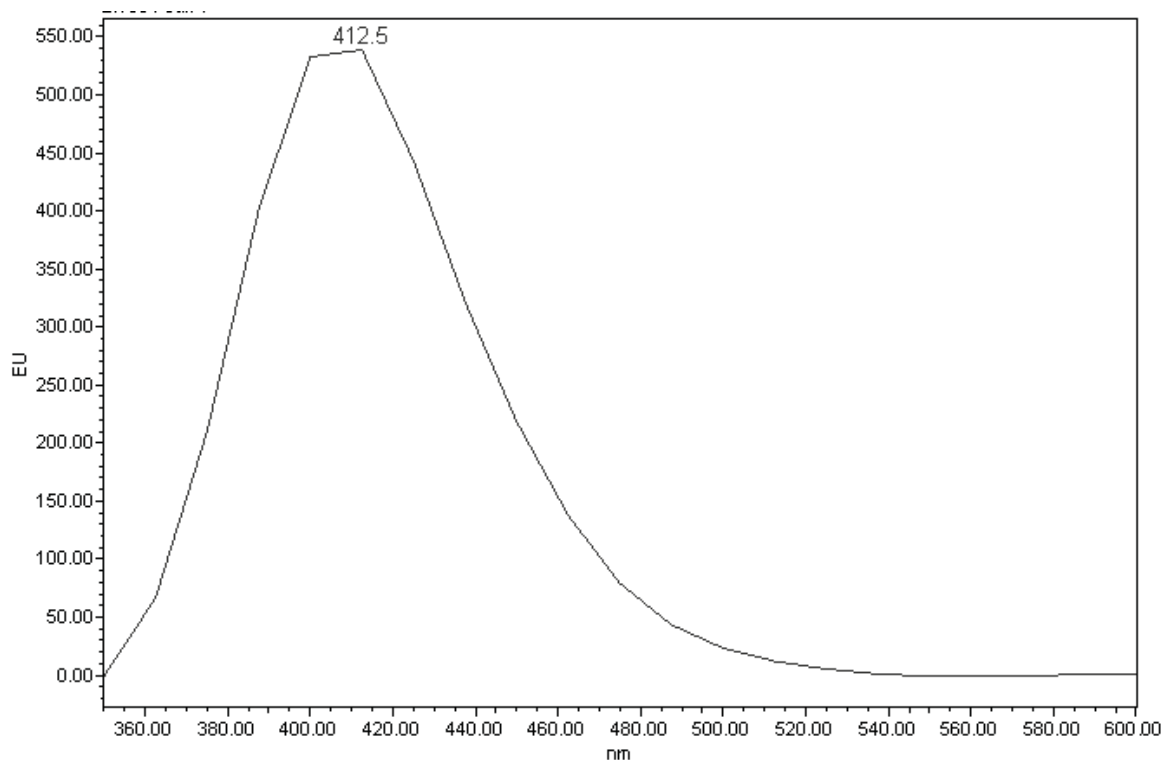


Figure 20 : Spectre de fluorescence de XDD pour une longueur d'onde d'excitation de 280nm.

2.4. Le CMBA

Le CMBA (acide 2-chloro-4-mesylbenzoïque) (figure 21) est un produit obtenu auprès d' « Apollo scientific limited », Denton, Manchester, UK. Le CMBA a une masse molaire de $234.66 \text{ g.mol}^{-1}$. Son spectre d'absorption est représenté dans la figure 22 et son spectre de fluorescence, après excitation à 280nm, est donné en figure 23.

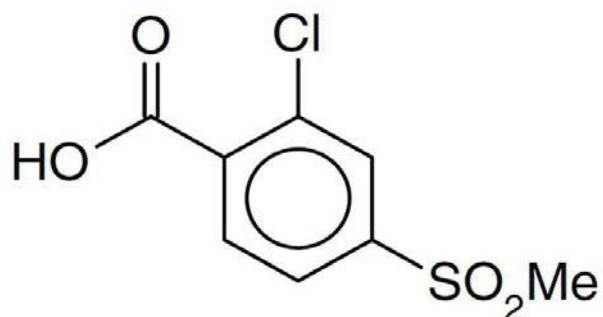


Figure 21: Formule développée de l'acide 2-chloro-4-mesylbenzoïque (CMBA)

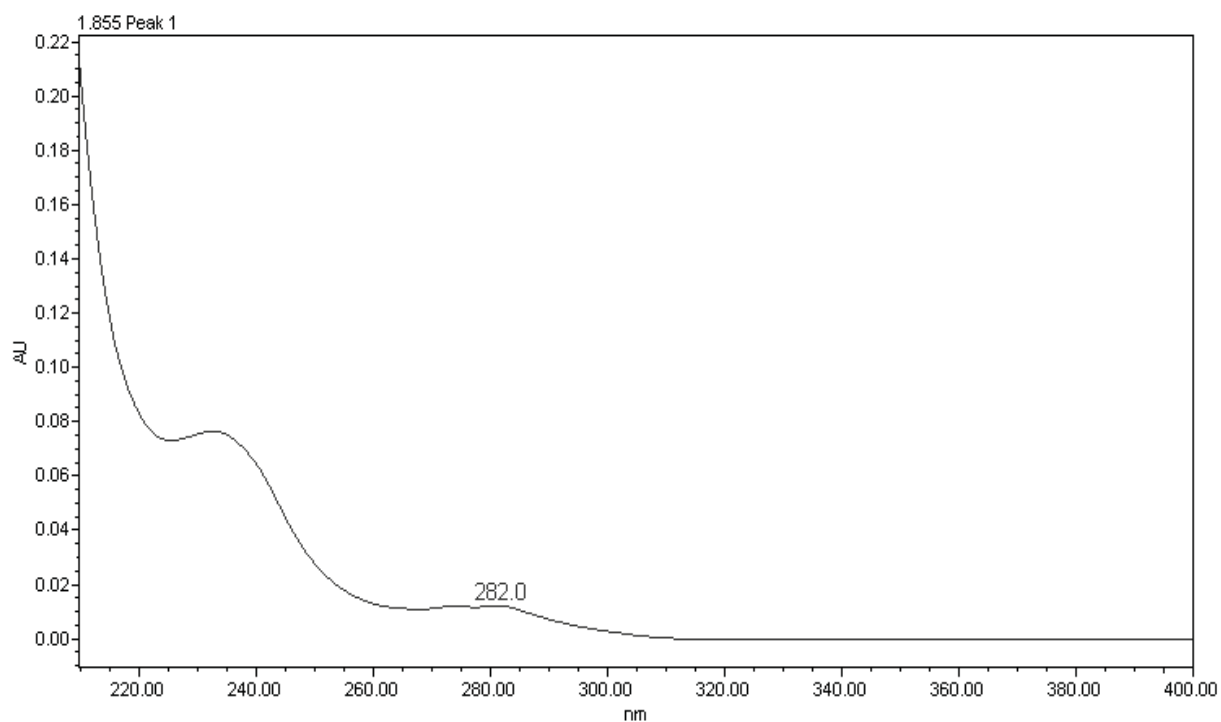


Figure 22 : Spectre d'absorption du CMBA en solution aqueuse.

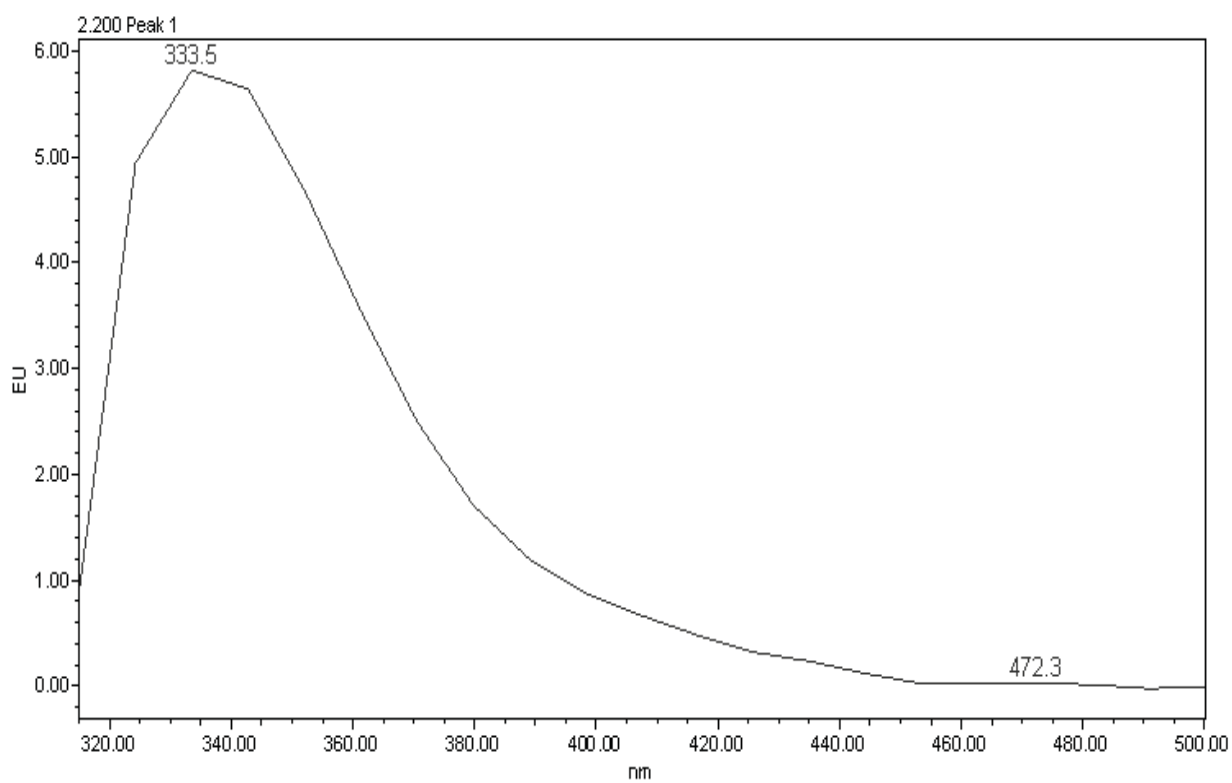


Figure 23 : Spectre de fluorescence du CMBA, avec une longueur d'onde d'excitation de 280nm

3. Etude Analytique

3.1. Spectroscopie UV-Visible

Les spectres d'absorption des solutions ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Cary 3 (Varian) à double faisceau ayant une précision de $\pm 0,002$ en absorbance.

3.2. Chromatographie en phase liquide à haute pression

Les chromatographies en phase liquide à haute pression sont réalisées avec une HPLC Waters® équipée d'un détecteur UV-visible à deux longueurs d'onde (type 2487), d'un détecteur de fluorescence à longueurs d'onde variables (type 2475), d'un module Waters 2695 comprenant deux pompes, un passeur d'échantillons thermostaté, un dégazeur et un four à colonne thermostaté. L'ensemble est piloté par le logiciel Empower®. La colonne utilisée est une colonne Phenomenex® (Kinetex®) en phase inverse (HSS T3 1.8 μm , 2.1 \times 100 mm, Waters®). Le débit du solvant dans la colonne a été fixé à 0.2 ml/min pour toutes les analyses. Le volume d'injection est de 50 μl pour toutes les analyses. Le solvant est un mélange 45% méthanol 55% H_2O et 0.1% acide formique. En raison du pKa des tricétones, le solvant utilisé pour les analyses a été préparé à partir d'eau ultrapure acidifiée avec 3 ml d'acide formique par litre d'eau. Le pH de l'éluant aqueux est alors fixé à 1, pH pour lequel la sulcotrione est protonée. Tous les échantillons étudiés sont filtrés avant analyse avec un filtre/seringue 0.2 μm .

3.3. Spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées au Centre Régional de Mesures Physiques (CRMP) de Clermont-Ferrand. L'appareillage utilisé est un Q-TOF-Micro/Waters® 2699 couplé à une HPLC Waters® équipée d'un détecteur UV-Visible, d'un module Waters 2695 comprenant deux pompes et un passeur d'échantillon thermostaté. Les composés sont séparés en phase inverse sur une colonne Phenomenex®. L'élution se fait avec un mélange d'acétonitrile et d'eau acidifiée avec l'acide formique (0,5%) en mode gradient. Le gradient d'élution commence avec 5% d'acétonitrile et atteint 95% en 15 min linéairement. La composition du gradient est maintenue pendant 10 minutes et ensuite ramenée à 5% d'acétonitrile en 10 minutes. Le débit est de 0,2 ml min⁻¹. Les composés sont ionisés par « electrospray » (ESI) et analysés en mode positif et négatif. La gamme des ions

détectés est m/z de 90 à 1000. Les chromatogrammes sont traités avec le logiciel MassLynx version 4.

4. Etudes statistiques

Les analyses statistiques de variances des données ont été réalisées sur tous les échantillons testés, à l'aide du logiciel Statistix9 et du logiciel JMP pro 10.

Le test de Dunnett a été utilisé pour comparer les échantillons traités par rapport aux échantillons contrôles avec une erreur seuil alpha de 0.05.

Les données issues de chaque traitement ont été analysées entre chaque concentration en utilisant un test ANOVA à un facteur suivi d'un test HSD de Tukey utilisé afin d'établir des groupes homogènes entre les données d'une même série de traitement.

Les droites de régression ont été établies grâce au logiciel JMP pro 10.

Résultats

Chapitre 1: Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem.

Goujon Eric, Sta Chaima, Trivella Aurélien, Goupil Pascale, Richard Claire, Ledoigt Gérard

1. Contexte

L'objectif de cette étude a été d'évaluer la toxicité de la sulcotrione, un herbicide de la famille des tricétones, lorsque celle-ci est soumise à une phototransformation. L'expérimentation utilisée a été réalisée en deux étapes. La sulcotrione (2×10^{-4} M) a d'abord été phototransformée sous conditions contrôlées jusqu'à un degré de conversion de 50 % de photoproduits accumulés. Ensuite, les tests sur *Allium cepa* sont réalisés en présence de ces échantillons d'herbicide irradiés dilués pour atteindre des concentrations de sulcotrione restante comprise entre 5×10^{-9} et 5×10^{-5} M. En parallèle, des expériences sont réalisées avec les mêmes concentrations de sulcotrione non irradiée pour déterminer l'effet de la molécule mère restante. Ainsi, nous pouvons évaluer la cytotoxicité et la génotoxicité de la sulcotrione avant et après irradiation et observer l'effet des photoproduits en mélanges avec la molécule mère.

2. Résultats et interprétations

Les traitements sont réalisés à partir d'une solution de sulcotrione pure ou à partir d'un mélange irradié contenant 50% de sulcotrione, 47% de XDD et 3% de CMBA.

Après avoir réalisé les différents comptages et en comparant les données obtenues entre les traitements « irradiés » et « non irradiés » deux résultats principaux sont obtenus:

a) Une baisse significative de l'indice mitotique causée par l'action des photoproduits de la sulcotrione. Cette cytotoxicité peut être soit le résultat d'une inhibition des mécanismes de la division cellulaire, soit le résultat d'une baisse de la quantité de cellules vivantes capables de se diviser.

b) Une augmentation significative de la fréquence des aberrations chromosomiques causées par les photoproduits de la sulcotrione.

3. Conclusions

La sulcotrione, principe actif d'un herbicide utilisé dans la culture des céréales, est génotoxique même pour de faibles concentrations, inférieures aux doses habituellement recommandées pour l'utilisation en agriculture. Pour des traitements à des concentrations supérieures, de 5.10^{-6} à 5.10^{-5} M, la fréquence des anomalies tend à se stabiliser. Ce résultat a aussi été observé sur une autre plante modèle, la fève (*Vicia faba*) (Sta *et al.*, 2012).

La sulcotrione irradiée induit une toxicité plus forte que la molécule mère seule. Les molécules issues de la phototransformation de la sulcotrione présentent un effet délétère sur la viabilité des cellules méristématiques d'*Allium cepa*

La gamme de traitement par le mélange sulcotrione et ses photoproduits présente une courbe d'évolution de la fréquence des anomalies chromosomiques très différente de celle du principe actif seul. Les mécanismes de génotoxicité des produits de transformation de la sulcotrione et ceux de la sulcotrione pure semblent donc différents. Une interaction entre ces mécanismes est envisageable pour expliquer la différence observée entre les profils de génotoxicité.

Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem.

Eric Goujon^a, Chaima Sta^a, Aurélien Trivella^b, Pascale Goupil^a, Claire Richard^b, Gérard Ledoigt^{a*}

^aClermont Université, UMR 547-UBP/INRA PIAF, Université Blaise Pascal, Campus universitaire des Cézeaux, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France,

^bClermont Université, CNRS, UMR 6296, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), 24, avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France

*Corresponding author: Tel.: +33 473407908. E-mail address: gerard.ledoigt@univ-bpclermont.fr

ABSTRACT

Contamination by toxic agents in the environment has become matters of concern to agricultural countries. Sulcotrione, a triketone herbicide used to control dicotyledonous weeds in maize culture is rapidly photolysed on plant foliage and generate two main photoproducts the xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl and 2-chloro-4-mesylbenzoic acid (CMBA). The aim of this study was to analyze the potential toxicity of the herbicide and the irradiated herbicide cocktail. Cytotoxicity and genotoxicity of non irradiated and irradiated sulcotrione were investigated in *Allium cepa* test. The sulcotrione irradiation was monitored under sunlight simulated conditions to reach 50% of phototransformation. Concentrations of sulcotrione in the range 5×10^{-9} - 5×10^{-5} M were tested. Cytological analysis of root tips cells showed that both non irradiated and irradiated sulcotrione caused a dose-dependent decrease of mitotic index with higher cytotoxicity for the irradiated herbicide which can lead to 24.2 % reduction of mitotic index compared to water control. Concomitantly, chromosomal aberrations were observed in *Allium cepa* root meristems. Both non irradiated sulcotrione and irradiated sulcotrione induced a dose-dependent increase of chromosomal abnormalities frequencies to a maximal value of 33.7%. A saturating effect in anomaly frequencies was observed in meristems treated with high

concentrations of non irradiated sulcotrione only. These data suggest that photolysed sulcotrione cocktail have a greater cytotoxicity and genotoxicity than parent molecule and question about the impact of photochemical process on environment.

Keywords: *Allium cepa*; genotoxicity; pesticide; photolysis; photoproducts; sulcotrione;

1. Introduction

Chemical pollutants reveal increasing threats to environment, amplified by population growth and climate change. Humans and ecosystems are exposed to highly variable and unknown cocktail of chemicals. Although individual chemicals are typically present at low concentrations, they can interact with each other resulting in additive or potentially synergistic mixture effects. The concomitant presence of various pesticides and their transformation products adds further complexity to chemical risk assessment [1]. Recent studies have proved that exposure to sunlight can be one of the most destructive factors for pesticides following the crop treatment [2]. Therefore, a fast herbicide degradation can reduce crop treatment efficiencies [3] and generate by-products [4] in the environment that can play a role in specifying the impact of pesticides on both natural ecosystems and human health [5–7].

2-(2-chloro-(4-methylsulfonyl)benzoyl)-1,3-cyclohexanedione also named sulcotrione, belongs to the class of triketone herbicides used in maize cultures and was proposed as atrazine substitute [8]. In target plant species, the action of sulcotrione consists in the inhibition of the enzyme 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) [9,10] leading to strong bleaching effects accompanied by a decrease in chlorophyll and carotenoid levels as well as by a massive accumulation of phytoene [11,12], necrosis and death of sensitive plants. Sulcotrione is absorbed by the leaves and or the root system [13,14] and may accumulate in the soil more than a month after application [13–15]. Water solubility of the product is 165 mg/L at 25° C with a great potential to leach [13,14]. It was assumed that maize population density was 100 000 plants per ha and application rate amounts to 300 g

of sulcotrione per ha [16]. It corresponds to a concentration of 3 mg of active substance per plant (or 30 mg/m²).

Although sulcotrione is used in crop protection scheme since 1993, its environmental fate is still poorly documented. In soils its major transformation product has been identified as 2-chloro-4-mesylbenzoic acid (CMBA)[14]. Sulcotrione absorbs in actinic part of solar light and undergoes direct photodegradation. The irradiated sulcotrione mainly gives a cyclization product (xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl), and CMBA formed in smaller amounts depending on pH of the solution [17]. These two photoproducts had no herbicide activity and present toxicity towards unicellular organisms different of sulcotrione toxicity. [16,18]. For bacteria and protozoan, the cyclization product was more toxic than the parent molecule suggesting that this photoproduct should be considered in sulcotrione environmental risk assessment [4,19]. It has clearly been demonstrated that the cyclization product (xanthene) is the main product formed and potential toxicity of this major product has been suggested [18]. In case of sulcotrione, oral administration to rats significantly inhibited hepatic HPPD [20].

Higher plants provide a useful genetic system for screening and monitoring environmental pollutants. Meristematic mitotic cells are appropriate indicator cells for the detection of genotoxicity. *Allium* and *Vicia* were shown as efficient test systems for root micronuclei and chromosomal aberrations [21]. Cytological analysis of *Vicia* root tips cells have previously shown aneugenic effects of sulcotrione. It induced chromosomal alterations at low concentration (10⁻⁵ M) indicating potent mutagenic effect of the herbicide. Moreover, sulcotrione is persistent for a short time but mobile in soil [13–15,22].

The present study establishes genotoxicity of sulcotrione on *Allium cepa* using cytogenetic bioassays by testing the changes of mitotic index (MI), and the frequencies of abnormal chromosomes. Potential genotoxic effects of the herbicide on *Allium* was compared to the one generated by irradiated sulcotrione solutions. This is the first study that reports the photochemistry impact on pesticide induced-genotoxicity.

2. Materials and methods

2.1 Irradiation conditions

Aqueous sulcotrione (2×10^{-4} M) was prepared in purified water and pH was adjusted to 2 to accelerate sulcotrione photodegradation rate. Sunlight-simulated irradiations were performed in a Suntest CPS photosimulator (Atlas). A 500 Wm^{-2} surface energy was used to simulate the sunlight average intensity received in June in France. The light intensity emitted by lamp within the wavelength range 290–420 nm was measured using a radiometer QE65000 from Ocean optics. The internal temperature was maintained at approximately $35 \pm 2^\circ\text{C}$ with cooled water (15°C) flowing through the bottom of the sample holder. Sulcotrione (200 mL) was irradiated in a 600 mL glass beaker reactor using a device equipped with an air cooling system.

2.2 Analytical equipment

UPLC-UV analyses were carried out at room temperature using a photodiode array detector chromatograph coupled with a reverse phase column (HSS T3 $1.8 \mu\text{m}$, 2.1×100 mm, Waters). A flow rate of $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ was used for all analyses. The gradient consisted of a mixture of 25 % acetonitrile and 75 % water (acidified with formic acid, pH 2.5). After 1 min, the proportion was linearly increased to 50 % acetonitrile within 9 min in order to monitor chromatographic separation of sulcotrione and its photoproducts. Detection was performed at 284 and 243 nm. At pH 2.5 the molar absorption coefficients are of $5500 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, $27\,300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, and $12\,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ for CMBA, xanthene and sulcotrione, respectively.

2.3 Plant assay system

Bulbs of onion (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) were purchased at local store. Bulbs were long-half traditional shallot, 24-44 caliber class 1, Bretagne origin. Pink shallots were “Jersey” variety and cultivated from a biological culture. Root tip cells of *Allium cepa* ($2n=16$) were used as test system and both sulcotrione (Sigma-Aldrich, France) and irradiated sulcotrione cocktail as test substances. Healthy bulbs were placed in small jars of 40 ml with basal ends dipping in distilled water and germinating in darkroom at room temperature ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$). When the newly emerged roots were 1-2 cm in length, they were washed and

used in experiments. Roots of *Allium* were treated with series of concentrations of non irradiated sulcotrione and irradiated sulcotrione. Treatments used irradiated samples diluted to reach concentrations of sulcotrione in the range 5×10^{-9} - 5×10^{-5} M. It is considered as the maximal concentration of sulcotrione to represent 3 mg of sulcotrione (the quantity for one plant) in 40 mL (the capacity of one flask). Concomitantly, a non irradiated sulcotrione treatment was made with the same sulcotrione concentration as the irradiated sulcotrione. All chemical treatments were conducted in 25 mM phosphate buffer pH 6.8 in order to neutralize sulcotrione solutions. Negative control was conducted in phosphate buffer and maleic hydrazide (4×10^{-3} M) was used as positive controls. Experiments were conducted for 48 h at room temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in a darkroom.

2.4 Cytotoxicity and genotoxicity tests

Excised root tips were fixed for 24 h in Clarke's solution (ethanol 99 % and glacial acetic acid 3:1) and then stored in 70 % ethanol at 4°C . Root tips were hydrolysed with 1N HCl for 5 min and incubated in acetic-orcein (1 %) for at least 30 min. Root tips were then squashed in 45% acetic-acid on slides and examined under an olympus microscope. 3 to 5 bulbs were tested for each concentration of non irradiated or irradiated treatment. 6 to 8 roots were examined separately for each bulb. The analysis of the mitotic index was made in random fields ($\approx 0.2 \text{ mm}^2$). An average of 500 cells was scored from each different root to get a total of 3000 cells for one bulb. MI was calculated from the number of dividing cells / total number of cells x 100. Chromosome aberrations i.e. chromatin bridges, stickiness, stars, laggard, vagrant chromosome and fragments were characterized in anaphase and telophase cells. All anaphase and telophase cells were accounting in the whole meristem of each root. Only roots with at least 20 anaphases and telophases were considered for the study. Chromosomal abnormality frequency was calculated from the number of aberrant cells / Anaphase and Telophase cells x100.

All experiments were performed in triplicate and repeated at least once. Each sample was encoded by another researcher in order to not influence the second one for determination of treatment genotoxicity.

2.5 Statistical analysis

Data from non irradiated sulcotrione and irradiated sulcotrione were compared using one way ANOVA analysis and Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test and correlated with Statistix 10.0 software. Differences between each group of abnormality were established using non parametric Kruskal-Wallis Analysis of Variance on Ranks analysis and Dunn's Test.

3. Results

3.1 Preparation of the irradiated sulcotrione cocktail

Substances used in plant bioassay system were the parent molecule (non irradiated sulcotrione) and irradiated sulcotrione cocktail. The cocktail corresponded to sulcotrione photodegraded in controlled conditions to a conversion extent of 50 %. After a half life of sulcotrione, the cocktail contained same amounts of sulcotrione molecule and metabolites. Typical UPLC chromatograms of the non irradiated sulcotrione (2×10^{-4} M) versus the 50 %-photolysed sulcotrione are shown in figure 1. The presence of sulcotrione (9.4×10^{-5} M), cyclization product (9.0×10^{-5} M) and CMBA (5.6×10^{-6} M) was verified in the irradiated sulcotrione cocktail. This 50 %-photolysed sulcotrione cocktail was gradually diluted with distilled water. For every dilution, the remaining sulcotrione concentration was calculated.

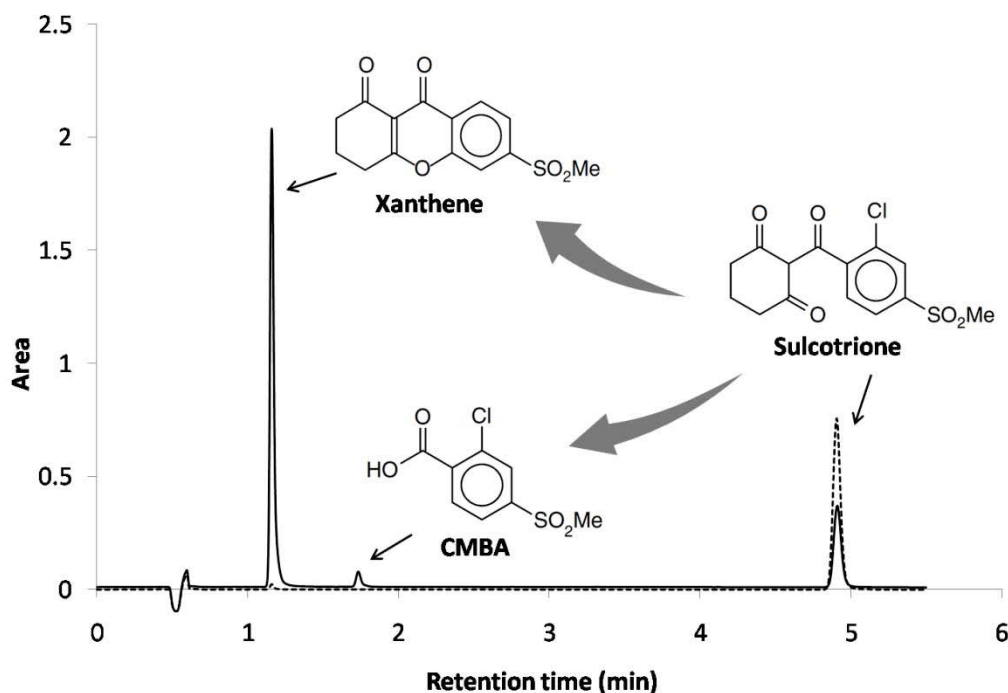


Figure 1: UPLC chromatogram of an aqueous solution of sulcotrione before (dotted line) and after (solid line) irradiation to a conversion extent of 50 % (detection at 240 nm). The boxed text shows mixture composition after irradiation of aqueous sulcotrione (2×10^{-4} M).

3.2 Mitotic Index

Cytotoxicity of non irradiated sulcotrione versus irradiated sulcotrione cocktail was investigated on *Allium* root cells at different concentrations. MI was cytologically determined after a period of 48h. MI of *Allium* root tips incubated in water (negative control) and in 4×10^{-3} M maleic hydrazine (positive control) were $9.8 \% \pm 0.5$ and $0.2 \% \pm 0.1$ respectively. As expected the maleic hydrazide treatment decreased MI in root meristems as compared to control plants.

MI measured on *Allium* meristems treated with non irradiated sulcotrione was compared to MI measured on root tips treated with irradiated sulcotrione cocktail. Both non irradiated and irradiated sulcotrione cocktails were tested at different concentrations after 48 h exposure (Fig.2). Mitotic index significantly decreased with higher herbicide concentrations of 5×10^{-7} M to a minimum of $7.5 \% \pm 0.5$ cells in mitosis at the highest non irradiated sulcotrione concentration (5×10^{-5} M).

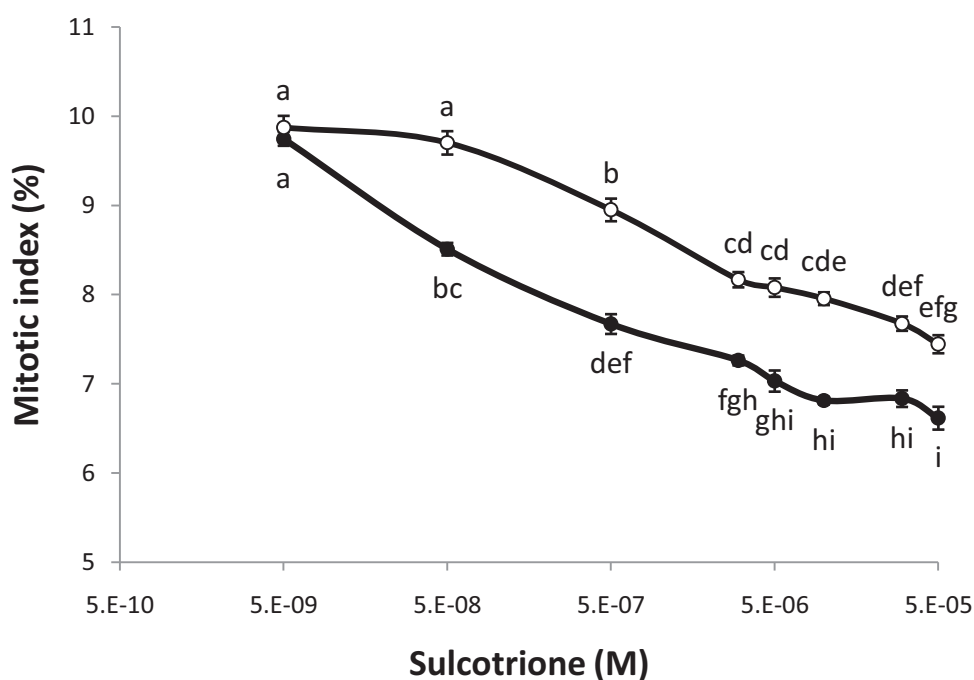


Figure 2: Mitotic Index mean (%) of root tips cells after 48 h treatment of non irradiated sulcotrione (○) and Irradiated sulcotrione (●) are shown against function of semi-logarithmic final sulcotrione concentration. Data represent an average (\pm SE) of 3–5 bulbs. Results of Tukey HSD all-pairwise comparisons test are indicated by different letters when values significantly differ at $p < 0.05$.

Compared to the negative control, MI was affected by the herbicide treatments. Both sulcotrione and irradiated sulcotrione cocktail treatments induced a similar dose dependent decrease of the MI in the *Allium* root tips. For non irradiated sulcotrione, the lowest concentration having a significant effect was 5×10^{-7} M of sulcotrione and lead to 8.81 % reduction of MI compared to water control. The highest non irradiated sulcotrione concentration (5×10^{-5} M) induced a 24.2% reduction compared to water control. When treated with irradiated sulcotrione cocktail, MI displayed 32.8% decrease in meristems treated with 5×10^{-5} M sulcotrione-containing cocktail compared to water control (Table 1). Compared with non irradiated sulcotrione treatments, root meristems lost 9.9% of their mitotic activity under herbicide cocktail treatment for all the concentrations tested (Table 1). These data suggest that presence of photoproducts in the sulcotrione treatments dramatically affected cell division in root meristem.

A significant difference between irradiated and non irradiated sulcotrione is shown for all concentrations of sulcotrione higher than 5×10^{-8} M. This data showed that both

sulcotrione and its cocktail with photoproducts had a cytotoxic effect on *Allium cepa* root tips.

	[sulcotrione] M	Spindle anomalies			Break anomalies			Sticky anomalies		
		Mean (%)	SE (%)		Mean (%)	SE (%)		Mean (%)	SE (%)	
Non irradiated sulcotrione	5.E-05	67.9	± 2.2		7.2	± 1.3		24.7	± 1.9	
	3.E-05	81.4	± 3.2		6.3	± 1.9		12.3	± 2.8	
	1.E-05	75.0	± 3.2		6.1	± 1.9		18.9	± 2.8	
	5.E-06	70.0	± 1.9		5.2	± 1.1		25.0	± 1.7	
	3.E-06	81.8	± 3.5		4.9	± 2.1		13.3	± 3.1	
	5.E-07	72.9	± 2.1		4.5	± 1.2		22.9	± 1.8	
	5.E-08	75.4	± 3.2		3.6	± 1.9		21.0	± 2.8	
	5.E-09	65.3	± 4.5		11.1	± 2.7		23.6	± 4.0	
	control	78.8	± 2.6		3.1	± 1.6		18.1	± 2.3	
Irradiated sulcotrione cocktail	5.E-05	74.0	± 2.4		5.9	± 1.3		20.1	± 2.4	
	3.E-05	69.5	± 3.0		3.4	± 1.7		27.1	± 3.0	
	1.E-05	78.4	± 3.0		2.8	± 1.7		18.9	± 3.0	
	5.E-06	71.1	± 1.8		7.4	± 1.0		21.6	± 1.8	
	3.E-06	74.6	± 2.9		5.1	± 1.6		20.3	± 2.9	
	5.E-07	72.9	± 2.0		4.1	± 1.1		23.8	± 2.0	
	5.E-08	84.7	± 3.7		0.0	± 2.1		15.3	± 3.7	
	5.E-09	84.3	± 3.3		3.9	± 1.8		11.8	± 3.3	
	control	75.8	± 2.4		3.7	± 1.3		20.5	± 2.4	

Table 1: Mean percentages of anomalies according to total cells containing chromosome aberrations. Spindle anomalies (vagrant, stars and laggards chromosomes). Breaks anomalies (bridge and fragments). Sticky anomalies are in specific category due to various origins. Differences between each group of abnormality were established using non parametric Kruskal-Wallis Analysis of Variance on Ranks analysis and Dunn's Test. There are no statistical differences between these values inside each group.

3.3 Chromosomal Aberrations

We investigated changes in the organization and morphology of the chromosomes in the *Allium* root tips exposed to the herbicide. Figure 3 represents photomicrographs of cytological analysis of mitotic anomalies induced by herbicide treatments. Six types of chromosome aberrations i.e. stickiness, bridges, vagrant chromosomes, stars, laggards, and fragments were recorded in anaphase-telophase cells (Fig.3 a-f). Three groups of anomalies were created according to origin type (Table 2). Bridge and fragments were induced by chromatid breaks. Vagrant chromosomes, stars and laggards were obtained by spindle anomalies. Chromosomal stickiness has been attributed to entanglement of inter-chromosomal chromatin fibers or affect peripheral proteins such as DNA topoisomerase-II [23]. Stickiness is considered to be a chromatid type aberration and attributed to the effect of environmental pollutants on degradation or depolymerization of chromosomal DNA [24] or DNA condensation [25] and on entanglement of insertions between chromosomes [26][27].

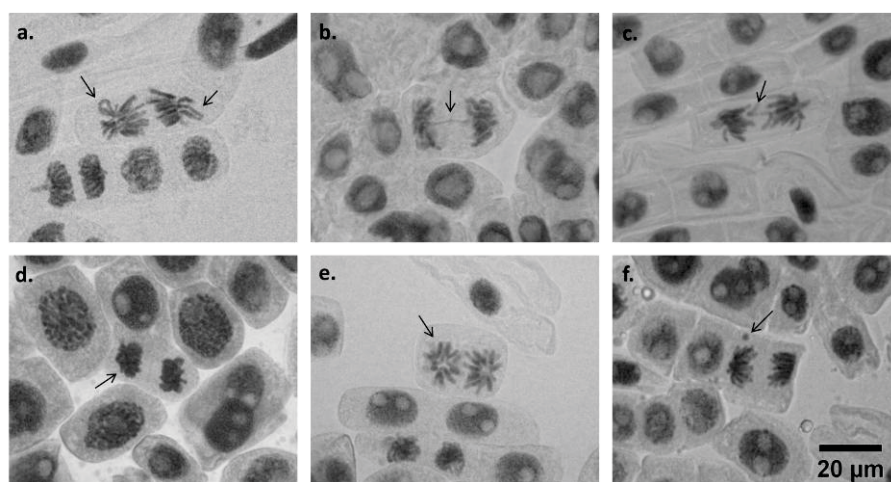


Figure 3: Chromosomal aberrations in *Allium cepa* root tip meristem cells in anaphase and telophase stage, visualized with light microscopy. (a.) Vagrants chromosomes; (b.) Chromatid bridges; (c.) Laggards; (d.) Stickiness; (e.) Stars; (f.) Fragments.

Stickiness, as an irreversible chromosome abnormality, commonly gives rise to cell death. Several chemicals have been reported to induce stickiness and results in these studies

are in agreement with those obtained after treating different materials with different pesticides [28–30]. Total percentages of these different groups according to total cells with chromosome aberrations were calculated (Table 2). Spindle abnormality was the most frequent chromosome aberration observed, but none of these groups seems to be dependent of treatment.

Abnormal chromosomes were quantified in *Allium* root tips treated for 48h with non irradiated sulcotrione and irradiated sulcotrione, both tested at different concentrations. Figure 4 shows anomaly frequencies induced by sulcotrione compared to those induced by herbicide cocktail. The control experiments conducted with *Allium* root tips treated with phosphate buffer showed a chromosomal abnormality frequency of $11.2 \% \pm 0.8$ in anaphase and telophase mitotic cells.

[sulcotrione] M	Amplitude difference (%)	
	Non irradiated sulcotrione	Irradiated Sulcotrione cocktail
5.E-05	23.9	32.8
3.E-05	21.6	30.6
1.E-05	18.7	30.8
5.E-06	17.4	28.6
3.E-06	16.5	26.2
5.E-07	8.5	22.1
5.E-08	0.8	13.6
5.E-09	-0.9	1.0
control	0.0	0.0

Table 2: Amplitude of diminish difference percentages of mitotic index versus control treatment.

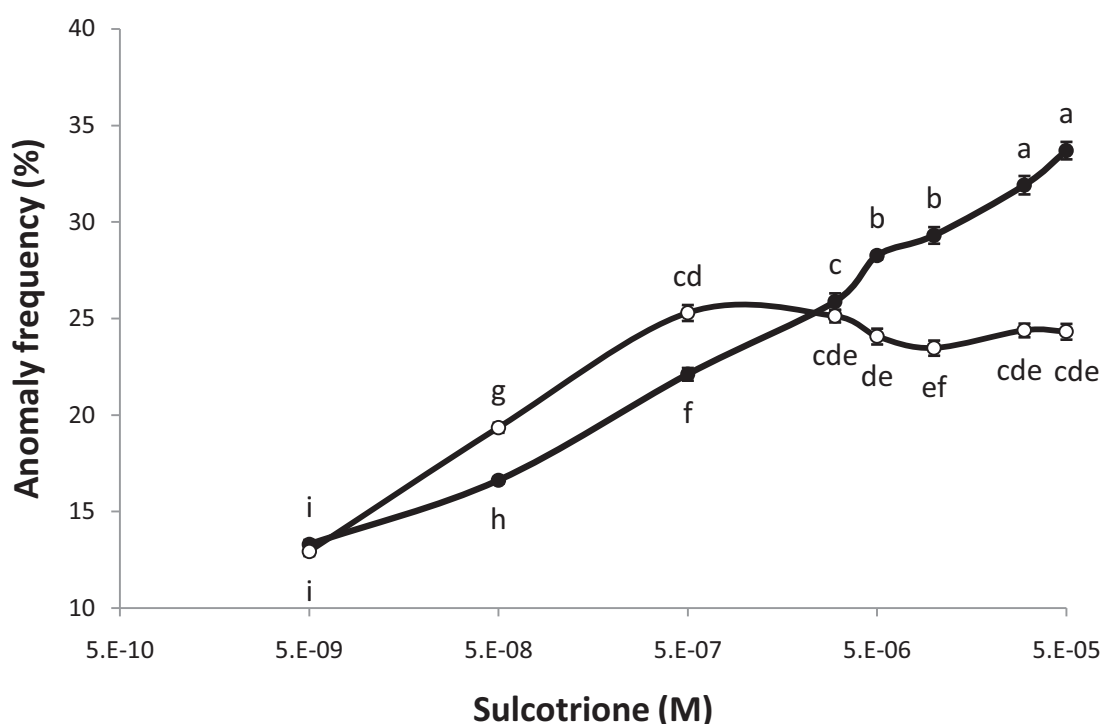


Figure 4: Anomaly Frequency mean (%) of anaphase and telophase cells after 48 h treatment of non irradiated sulcotrione (○) and irradiated sulcotrione (●) are shown against function of semi-logarithmic final sulcotrione concentration. Data represent an average (\pm SE) of 3–5 bulbs. Results of Tukey HSD all-pairwise comparisons test are indicated by different letters when values significantly differ at $p < 0.05$.

Frequencies of cells with abnormal chromosomes increased with increasing non irradiated sulcotrione concentration and reached a plateau above the 5.10^{-7} M concentration. On the contrary, herbicide cocktail induced an increase of anomaly frequencies without any saturating effect. Higher concentration (5.10^{-5} M) of herbicide cocktail induced $33.7 \% \pm 2.2$ of mitotic abnormalities that was significantly higher than one induced by non irradiated sulcotrione ($24.3 \% \pm 2.1$ of abnormalities). Genotoxicity measures using *Allium* ana-telophase test were evaluated after 48 h exposure time (Fig.4). A control sample showed a chromosomal abnormality frequency of $11.2 \% \pm 0.7$ in anaphase and telophase stage cells.

Significant differences between non irradiated and irradiated sulcotrione are observed for concentration higher than 5×10^{-6} M of sulcotrione, with toxicity increasing with

higher sulcotrione photoproduct quantities. Irradiation of sulcotrione enhanced toxicity of herbicide and lead to a high chromosomal aberration rate in *Allium cepa* root tips.

The two toxicity curves were different: from 5×10^{-9} to 5×10^{-7} M sulcotrione, both curves were increasing, but with different slopes that indicated different targets; then from 5×10^{-7} to 5×10^{-5} M, the sulcotrione curve slightly decreased or looked like a plateau, in contrast, the herbicide cocktail curve was going on straight, in a semi-logarithm graph (Fig.4).

4. Discussion

Under influence of polychromatic radiation, sulcotrione in aqueous solution produces 1H-xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl (xanthene) and 2-chloro-4-methylsulfonyl-benzoic acid (CMBA), which are result of intra-molecular cyclization and hydrolysis of sulcotrione, respectively. Studies of Wiszniowski et al [31] showed an increase in toxicity towards tested organism (*Vibrio fischeri* bacteria) with the increase of irradiation time and appearance of the photoproducts.

MI is considered a parameter that allows to estimate frequency of cellular division. All experiments were carried out when roots reached 2-3 cm in length. At this time, roots are in active growth. Irradiated sulcotrione had a higher effect on mitotic index and chromosomal aberration frequency than non irradiated sulcotrione for the same concentration of sulcotrione. Irradiated sulcotrione is degraded by UV exposure and is transformed to specific photoproducts. UPLC analyses showed that two major products are obtained after irradiation: a xanthene derivative and CMBA. Impact of these photoproducts in environment is not well known but we observed a statistical increase of genetic toxicity after using irradiated sulcotrione cocktail in an *Allium cepa* test. Toxicity of an active molecule like pesticide does not necessarily stop with its degradation. By-products could have harmful effect in the environment and could have serious implications for the future. Toxicity mechanism of photoproducts is not known, but degradation of sulcotrione does not reduce toxicity of the mixture and effect is still enhanced at higher concentrations.

Sulcotrione induces a decrease of photosynthesis for *Sinapis alba* species while *Zea mays* species were lightly changed [25]. On the contrary, xanthene had no herbicide activity

on both species. It was shown that xanthenes probably do not block HPPD active site [16]. Xanthene was shown to be the most harmful photoproduct towards bacteria, as EC_{50} values are about nine- and sevenfold lower than those of sulcotrione and CMBA respectively [18]. Cocktail of sulcotrione and its photoproducts have a far higher cytotoxicity, measured by mitotic index, than active herbicide alone. Moreover, genotoxicity mechanisms are different between sulcotrione and its irradiated cocktail. We observed higher frequencies of vagrant and lagging chromosomes as a percentage of total aberrations after exposure to pesticide (Table 2). Presence of these anomalies is an indication of anti-microtubule activities for the pesticides tested, as describe for other pesticides [32].

In *Allium cepa*, concentrations from 5×10^{-9} M to 5×10^{-7} M of sulcotrione showed increased chromosomal aberrations (Fig.4). Then, chromosomal aberrations slightly decreased as it was described for *Vicia faba* [22]. Moreover sulcotrione treatments of *A. cepa* did not show a linear correlation between frequency of chromosomal aberrations and mitotic index (Fig.5). Therefore, genotoxic effect of sulcotrione treatment is not linked to mitosis inhibition, as for *Vicia faba* [22]. On the other hand photoproducts seem to hide non irradiated sulcotrione effect and show an exponential correlation between mitotic index and aberration frequency. Using another pesticide of the same molecular type, it was shown that treatments with insecticide dichlorvos on root meristems of *V. faba*, significantly decreased mitotic activity and increased frequency of chromosomal aberrations at metaphase thus demonstrating both clastogenic and mito-depressive effects of the insecticide on *V. faba* cells [33].

Our study showed that irradiation of sulcotrione enhanced toxicity of herbicide on *Allium cepa* root tips. The two toxicity curves are different. From 5×10^{-9} to 5×10^{-7} M sulcotrione, both genotoxicity curves were increasing, but with a different slope that indicated different mechanism targets. Therefore, sulcotrione can induce chromosomal anomalies till saturation, while cocktail of sulcotrione and its photoproducts continued to induce chromosomal aberrations. Moreover, in mixture of sulcotrione and photoproducts, genotoxicity of sulcotrione cannot be observed when by-products are present thus photoproducts would have a higher toxicity than sulcotrione alone (Fig.4 and 5).

It has been already demonstrated that some chromosomal aberration may occur by non direct genotoxic effect. Some damage induced by metals can inhibit DNA repair mechanisms by competition with certain ions which are essential for DNA polymerases, for example [34,35]. This indirect genotoxic effect can be produced at very low chemical concentration and enhance chromosomal aberration frequency significantly. Indeed some chromosomal aberrations were induced by DNA breaks, but repair mechanisms intervened to repair these anomalies to maintain genome integrity [36]. Moreover, some pesticide may cause indirect genotoxic effect, like the glyphosate which can decrease DNA repair [37]. This could explain differences of effects between mixture and sulcotrione.

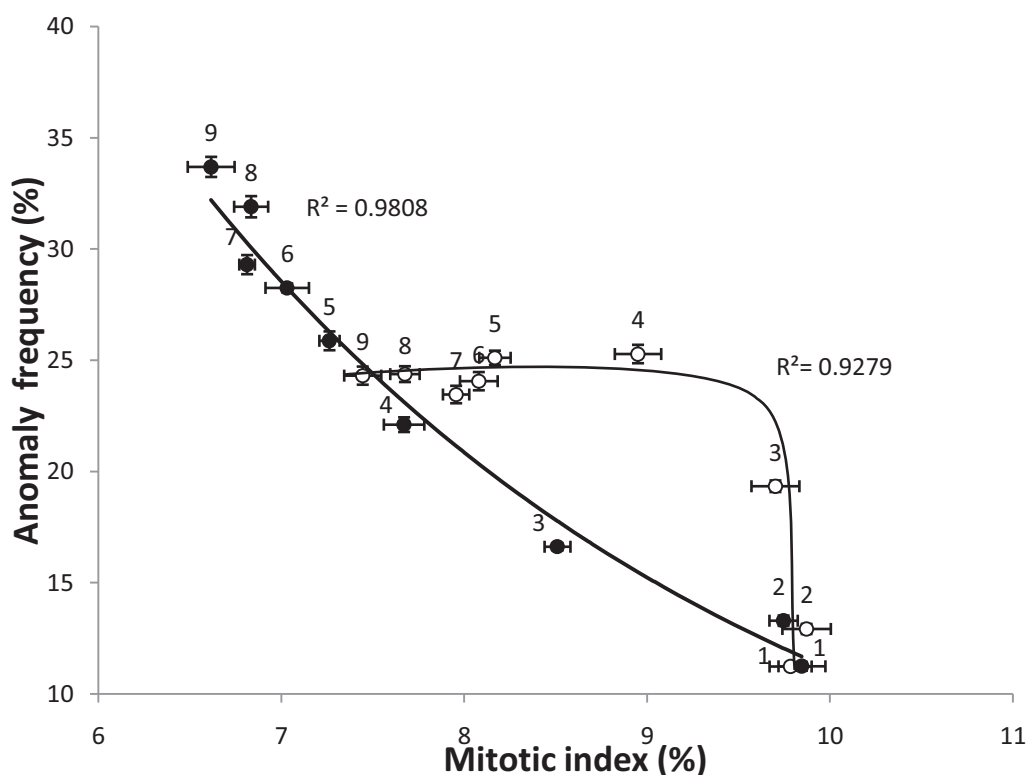


Figure 5: Correlation between Anomaly Frequency mean (\pm SE) and Mitotic Index mean (\pm SE) after 48 h treatment with non irradiated sulcotrione (\circ) and irradiated sulcotrione (\bullet). Each point corresponds to a specific sulcotrione concentration: control (1), 5×10^{-9} M (2), 5×10^{-8} M (3), 5×10^{-7} M (4), 3×10^{-6} M (5), 5×10^{-6} M (6), 1×10^{-5} M (7), 3×10^{-5} M (8) and 5×10^{-5} M (9). Correlation curve has been drawn with an exponential equation for irradiated sulcotrione, and with a Richards model for non irradiated sulcotrione.

In contrast to mixture, non irradiated sulcotrione displays chromosome aberration frequencies that are not correlated to mitotic index (Fig.5), i.e. chromosomal aberrations are increased without change of mitotic index then mitotic index is decreased without change in chromosome aberration frequency. Treatments with some chemicals have been shown to induce deregulation of the cell cycle events [38]; activation of surveillance mechanism stops the cell cycle, allowing time for completion of a particular cell cycle event. These checkpoints are essential to cell survival under adverse conditions, and alteration of one of these checkpoints by a xenobiotic agent could disorganize all the division processes and lead to aberrant mitosis [39]. On the other hand, irradiated sulcotrione cocktail leads to an exponential correlation between mitotic index and chromosomal aberration frequencies. We suspect that these two treatments cause two different mechanisms which are handled differently by the cells and lead to different genotoxic pathways as described previously.

Pesticides were often mixed with other molecule types like other pesticide or pesticides by-products for example. Components of a mixture can interact each other to change the toxicological effects. It was shown that cocktail composed of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and dieldrin, was more toxic than the additive effect estimated from their separate toxicities [40]. Furthermore, there were more apoptosis induction in a cocktail than predicted by adding the effects of DDT and dieldrin, then showing a synergic toxicity in the cocktail [40]. In *Allium cepa*, the most common aberrations observed in treatments by Chlorfenvinphos and fenbuconazole were sticky and laggard chromosomes, micronuclei, anaphase bridges, c-mitosis. Specific chromosome aberrations were observed according to pesticide treatments; laggard chromosome was observed only in treatments with fenbuconazole. [41]. Lagging chromosomes are formed as the result of one or more chromosomes or chromatids fall behind at anaphase. Additionally, acentric chromosome fragments remain as laggards. These results are in agreement with the results of many research groups that examined the effects of different chemicals on different test systems [29,41–44]. Mixtures of pesticides with similar chemical structures are not always able to cause additive effects, for they may produce different toxic effects if compounds act on different sites. Some pesticide mixture can also interact with detoxification which can result in an enhanced or reduced toxicity [45]. Chemistry and environmental stability of each individual photoproduct can be substantially different from those of the original pesticide.

Conclusions

The present study demonstrated toxicity of sulcotrione mixture after photodegradation. Non irradiated and irradiated sulcotrione caused a dose-dependent decrease of mitotic index. Sulcotrione and photoproducts increase chromosomal abnormality frequencies. Photodegraded sulcotrione cocktail has shown a greater toxicity of the mixture than parent molecule. Furthermore, it is highlighted two different mechanisms leading to a toxic effect.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Europe (FEDER) and Auvergne Région Council. We thank Céline Sac, Dominique Marcon for their skillful assistance and Dr. Boris Fumanal for his helpful comments on the manuscript.

References

- [1] B.I. Escher, K. Fenner, Recent Advances in Environmental Risk Assessment of Transformation Products, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 3835–3847.
- [2] T. Katagi, Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces, in: G.W. Ware (Ed.), *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* Vol 182, Springer, New York, 2004: pp. 1–189.
- [3] G. Mangels, Behavior of the imidazolinone herbicides in the aquatic environment, in: D.L. Shanner, S.L. O’Conner (Eds.), *Imidazolinone Herbic.*, CRC Press, 1991: pp. 183–190.
- [4] A. Ter Halle, D. Drncova, C. Richard, Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 2989–2995.
- [5] K. Mitsou, A. Koulidou, D. Lambropoulou, P. Pappas, T. Albanis, M. Lekka, Growth rate effects, responses of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanil in the aquatic plant *Lemna minor*, *Chemosphere*. 62 (2006) 275–284.
- [6] E. Vulliet, C. Emmelin, J.M. Chovelon, C. Chouteau, B. Clement, Assessment of the toxicity of triasulfuron and its photoproducts using aquatic organisms, *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2004) 2837–2843.

- [7] E. Bjorklund, G.G. Anskjaer, M. Hansen, B. Styrishave, B. Halling-Sorensen, Analysis and environmental concentrations of the herbicide dichlobenil and its main metabolite 2,6-dichlorobenzamide (BAM): A review, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 2343–2356.
- [8] J.S. Kim, T.J. Kim, O.K. Kwon, K.Y. Cho, Mechanism of action of sulcotrione, a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor, in developed plant tissues, *Photosynthetica.* 40 (2002) 541–545.
- [9] a Schulz, O. Ort, P. Beyer, H. Kleinig, SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase., *FEBS Lett.* 318 (1993) 162–166.
- [10] J. Secor, Inhibition of barnyardgrass 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by Sulcotrione, *Plant Physiol.* 106 (1994) 1429–1433.
- [11] T. Soeda, T. Uchida, Inhibition of pigment synthesis by 1,3-dimethyl-4-(2,4-dichlorobenzoyl)-5-hydroxypyrazole, Norflurazon, and new herbicidal compounds in radish and flatsedge plants, *Pestic. Biochem. Physiol.* 29 (1987) 35–42.
- [12] D.J. Mayonado, K.K. Hatzios, D.M. Orcutt, H.P. Wilson, Evaluation of the mechanism of action of the bleaching herbicide sc-0051 by HPLC analysis, *Pestic. Biochem. Physiol.* 35 (1989) 138–145.
- [13] R. Cherrier, A. Boivin, C. Perrin-Ganier, M. Schiavon, Sulcotrione versus atrazine transport and degradation in soil columns, *Pest Manag. Sci.* 61 (2005) 899–904.
- [14] R. Cherrier, C. Perrin-Ganier, M. Schiavon, Degradation of sulcotrione in a brown soil amended with various organic matters, *Agronomie.* 24 (2004) 29–33.
- [15] H. Chaabane, J.F. Cooper, L. Azouzi, C.M. Coste, Influence of soil properties on the adsorption-desorption of sulcotrione and its hydrolysis metabolites on various soils, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4091–4095.
- [16] J. Wiszniowski, A. Ter Halle, C. Richard, A. Hitmi, G. Ledoigt, Photodegradation product of sulcotrione and the physiological response of maize (*Zea mays*) and white mustard (*Sinapis alba*), *Chemosphere.* 74 (2009) 1224–1230.
- [17] C. Calvayrac, N. Bontemps, A. Nougues-Bissou, S. Romdhane, C.-M. Coste, J.-F. Cooper, Photolysis of tembotrione and its main by-products under extreme artificial conditions: Comparison with another beta-triketone herbicide, *Sci. Total Environ.* 452–453 (2013) 227–232.
- [18] A. Ter Halle, J. Wiszniowski, A. Hitmi, G. Ledoigt, F. Bonnemoy, J.L. Bonnet, *et al.*, Photolysis of the herbicide sulcotrione: formation of a major photoproduct and its toxicity evaluation, *Pest Manag. Sci.* 65 (2009) 14–18.
- [19] J.L. Bonnet, F. Bonnemoy, M. Dusser, J. Bohatier, Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55 (2008) 576–583.

- [20] N.X. Wu, Y. Jin, F. Jin, Y.F. Tan, H. Tao, M.Y. Zheng, *et al.*, Effects of sulcotrione 2-(2-chloro-4-mesylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione on enzymes involved in tyrosine catabolism and the extent of the resulting tyrosinemia and its relationship with corneal lesions in rats, *Pestic. Biochem. Physiol.* 99 (2011) 162–169.
- [21] T.H. Ma, Z.D. Xu, C.G. Xu, H. McConnell, E. V Rabago, G.A. Arreola, *et al.*, The improved allium vicia root-tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental-pollutants, *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 334 (1995) 185–195.
- [22] C. Sta, G. Ledoigt, E. Ferjani, P. Goupil, Exposure of *Vicia faba* to sulcotrione pesticide induced genotoxicity, *Pestic. Biochem. Physiol.* 103 (2012) 9–14.
- [23] M.E. Gaulden, Hypothesis: some mutagens directly alter specific chromosomal proteins (DNA topoisomerase II and peripheral proteins) to produce chromosome stickiness, which causes chromosome aberrations, *Mutagenesis.* 2 (1987) 357–365.
- [24] C.D. Darlington, J. Mcleish, Action of Maleic Hydrazide on the Cell, *Nature.* 167 (1951) 407–408.
- [25] R. Österberg, D. Persson, G. Bjursell, The Condensation of DNA by Chromium (III) Ions, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2 (1984) 285–290.
- [26] L.K.S. Chauhan, T.S.S. Dikshith, V. Sundararaman, Effect of deltamethrin on plant cells I. Cytological effects on the root meristems of *Allium cepa*, *Mutat. Res. Toxicol.* 171 (1986) 25–30.
- [27] B.C. Patil, G.I. Bhat, A comparative study of MH and EMS in the induction of chromosomal aberrations on lateral root meristem in *Clitoria ternatea* L., *Cytologia (Tokyo).* 57 (1992) 259–264.
- [28] L.K.S. Chauhan, P.N. Saxena, V. Sundararaman, S.K. Gupta, Diuron-Induced Cytological and Ultrastructural Alterations in the Root Meristem Cells of *Allium cepa*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 62 (1998) 152–163.
- [29] B. Ateeq, M.A. Farah, M.N. Ali, W. Ahmad, butachlor evaluated by *Allium* root tip test, *Mutat. Res.* 514 (2002) 105–113.
- [30] T.C.C. Fernandes, D.E.C. Mazzeo, M.A. Marin-Morales, Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 1680–1686.
- [31] J. Wiszniowski, A. Ter Halle, C. Richard, F. Bonnemoy, J. Bohatier, Toxicity of sulcotrione photoproducts mixture towards *vibrio fischeri* in the aquatic environment, *Arch. Environ. Prot.* 37 (2011) 15–23.
- [32] G. Voutsinas, F.E. Zarani, A. Kappas, The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*, *Cell Biol. Int.* 21 (1997) 411–418.

- [33] R. Kontek, R. Osiecka, B. Kontek, Clastogenic and mitodepressive effects of the insecticide dichlorvos on root meristems of *Vicia faba*, *J. Appl. Genet.* 48 (2007) 359–361.
- [34] A. Hartwig, Role of DNA-repair inhibition in lead-induced and cadmium-induced genotoxicity - a review, *Environ. Health Perspect.* 102 (1994) 45–50.
- [35] A. Cebulska-Wasilewska, A. Panek, Z. Żabiński, P. Moszczyński, W.W. Au, Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 586 (2005) 102–114.
- [36] P. Vodicka, R. Kumar, R. Stetina, S. Sanyal, P. Soucek, V. Haufröid, *et al.*, Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA, *Carcinogenesis*. 25 (2004) 757–763.
- [37] T. Cavas, S. Konen, Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay, *Mutagenesis*. 22 (2007) 263–268.
- [38] A. Zabka, J.T. Polit, J. Maszewski, DNA replication stress induces deregulation of the cell cycle events in root meristems of *Allium cepa*., *Ann. Bot.* 110 (2012) 1581–91.
- [39] D. Rybaczek, A. Bodys, J. Maszewski, H2AX foci in late S/G2- and M-phase cells after hydroxyurea- and aphidicolin-induced DNA replication stress in *Vicia*., *Histochem. Cell Biol.* 128 (2007) 227–41.
- [40] V. Graillot, N. Takakura, L. Le Hegarat, V. Fessard, M. Audebert, J. Cravedi, Genotoxicity of Pesticide Mixtures Present in the Diet of the French Population, *Environ. Mol. Mutagen.* 53 (2012) 173–184.
- [41] S. Turkoglu, Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay, *Pestic. Biochem. Physiol.* 103 (2012) 224–230.
- [42] K. Srivastava, K.K. Mishra, Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 93 (2009) 8–12.
- [43] L.K.S. Chauhan, P.N. Saxena, S.K. Gupta, Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*, *Environ. Exp. Bot.* 42 (1999) 181–189.
- [44] R. Çelik, M., Yüzbaşıoğlu. D., Ünal, F., Arslan, O. and Kasap, Effects of dinocop on the mitosis of *Allium cepa* L, *Cytologia (Tokyo)*. 70 (2005) 13–22.
- [45] A.F. Hernández, T. Parrón, A.M. Tsatsakis, M. Requena, R. Alarcón, O. López-Guarnido, Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health, *Toxicology*. (2012).

Chapitre 2: Cytotoxicity on *Allium cepa* of the two main sulcotrione photoproducts, xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl and 2-chloro-4-methylbenzoic acid.

Goujon Eric, Richard Claire, Goupil Pascale, Ledoigt Gérard

1. Contexte

Suite aux expérimentations réalisées sur une solution de sulcotrione phototransformée à 50%, nous avons voulu identifier plus précisément l'impact des différentes molécules issues de la phototransformation de la sulcotrione. Dans un premier temps nous avons étudié la toxicité de la solution de sulcotrione au cours de sa phototransformation. Pour cela, une solution de sulcotrione 10^{-5} M a été irradiée jusqu'à 3h30 en milieu acide et cinq prélèvements de la solution ont été réalisés à différents temps. Après avoir caractérisé par HPLC les constituants des mélanges irradiés, un test sur *Allium cepa* a été effectué pour évaluer leur toxicité. Des analyses de toxicité ont également été réalisées sur les principaux photoproduits pris individuellement. L'acide 2-chloro-4-méthylsulfonylbenzoïque (CMBA) et le 1,9-dione-3,4-dihydro-6-méthylsulfonyl xanthène (XDD) identifiés dans les mélanges de sulcotrione irradiée, ont été testés séparément sur le modèle *Allium cepa* dans une gamme de concentrations allant de 10^{-9} M à $5 \cdot 10^{-5}$ M.

2. Résultats

Les traitements sont réalisés à partir d'une solution de sulcotrione pure à différents temps de phototransformation. La solution avant irradiation contient 10^{-5} M de sulcotrione alors que le mélange obtenu après 3h30 d'irradiation contient 1.8×10^{-6} M de sulcotrione 8.4×10^{-6} M de XDD et 1.1×10^{-6} M de CMBA.

Nous observons que plus la sulcotrione est phototransformée, plus une diminution de l'indice mitotique ainsi qu'une augmentation des fréquences d'anomalies sont observées. Ces observations sont caractéristiques d'une toxicité croissante dans le méristème racinaire. L'apparition significative de nouvelles anomalies de type "c-mitosis" est observée pour les temps de phototransformation plus grands.

La baisse de l'indice mitotique et la hausse de la fréquence d'anomalies lors de traitements par des concentrations croissantes de CMBA démontrent une toxicité de cette molécule sur des méristèmes racinaires d'*Allium cepa*. De plus, une augmentation des "c-mitosis" est aussi observée ce qui concorde avec les résultats obtenus avec le mélange des photoproduits.

La baisse de l'indice mitotique et la hausse de la fréquence d'anomalies lors de traitements par des concentrations croissantes de XDD démontrent aussi une toxicité de cette molécule sur les méristèmes racinaires d'*Allium cepa* pour des concentrations basses. De plus, on observe une augmentation significative du taux de micronoyaux lors des traitements à plus hautes concentrations, mais aucune augmentation significative des "c-mitosis".

3. Conclusions

Les produits de phototransformation de la sulcotrione semblent plus toxiques que la molécule mère. De plus nous avons pu observer une toxicité spécifique à chaque molécule produite lors de cette dégradation. Le CMBA semble avoir une action inhibitrice sur le fonctionnement des microtubules ce qui entraîne la formation de "c-mitosis", alors que la molécule XDD favorise l'apparition de micronoyaux, causée soit par des cassures chromosomiques ou soit par une mauvaise migration des chromosomes au cours de l'anaphase.

Cytotoxicity on *Allium cepa* of the two main sulcotrione photoproducts, xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl and 2-chloro-4-mesylbenzoic acid.

Goujon Eric ^a, Richard Claire ^b, Goupil Pascale ^a, Ledoigt Gérard ^{a*}

^a*Clermont Université, UMR 547-UBP/INRA PIAF, Université Blaise Pascal, Campus universitaire des Cézeaux, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France*

^b*CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63171 Aubière, France*

*Corresponding author: Tel.: +33 473407908. E-mail address: gerard.ledoigt@univ-bpclermont.fr

ABSTRACT

The cytotoxic effects of 2-chloro-4-mesylbenzoic acid (CMBA) and xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl (XDD), the two main photoproducts of sulcotrione were investigated on *Allium* root meristematic cells at different concentrations. Degradation of sulcotrione was correlated to mitotic index decrease, together with increasing anomaly and c-mitosis frequencies. Mitotic index significantly decreased with increasing XDD and CMBA concentrations. Cell frequency with abnormal chromosomes increased with CMBA or XDD application rates. In contrast, CMBA induced a low micronucleus rate even for high concentrations while XDD increased micronucleus ratio. C-mitoses, chromosomal aberrations due to an inactivation of the spindle, were enhanced by CMBA treatments but not by XDD. Photochemical degradation process of pesticide can change the risk for environment.

Keywords: *Allium cepa*, Genotoxicity, Pesticide, Photolysis, Sulcotrione.

1. Introduction

Sulcotrione chemically defined as 2-(2-chloro-(4-methylsulfonyl)benzoyl)-1,3-cyclohexanedione, is a triketone herbicide used in maize cultures and is proposed as an atrazine substitute.[1]. It is applied on corn crop at 400 g ha^{-1} to control development of broad leaf weeds [2]. In target plant species, sulcotrione is absorbed by leaves and roots [3,4] and inhibits the enzyme 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (p-HPPD) [5,6] leading to a massive accumulation of phytoene and a decrease in chlorophyll and carotenoid levels [7,8], which induce necrosis and death of sensitive plants.

Sulcotrione can remain in soil until more than a month after application [4,9]. Sulcotrione degradation in soil is influenced by biotic and/or abiotic factors [3]. Half-life ranges between 45 and 65 days in soil and is of 8 days with microflora [2]. 1,3-Cyclohexanedione (CHD) and 2-chloro-4-mesylbenzoic acid (CMBA) are among the observed degradation compounds [10]. They arise following sulcotrione hydrolysis. Sulcotrione also absorbs solar light and undergoes direct photodegradation which has been documented in the literature [11–13]. Photoproducts formed through irradiation of sulcotrione have been identified [11,14]. Photohydrolysis leads to CMBA and photocyclisation resulting from HCl elimination yields xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl (XDD) [15]. This latter reaction is favored upon aqueous medium acidification and when sulcotrione is irradiated as a dry deposit. These two photoproducts have no herbicide property and show toxicity towards unicellular organisms. Moreover, XDD is more toxic than sulcotrione toward *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri* [12,16].

Previously, we have shown that both sulcotrione and its irradiated solutions are a genotoxic [17]. We have used cytogenetic bioassays on *Allium cepa* by testing the changes of the frequencies of abnormal chromosomes and mitotic index (MI). Micronucleus frequency evaluation was another way to show potential genotoxicity of a compound. We have concluded that photodegraded sulcotrione have a greater toxicity than parent molecule [17]. The aim of the present work was to study the toxicity of two main sulcotrione photoproducts, XDD and CMBA, by using *Allium cepa* test and to compare their genotoxicity and cytotoxicity.

2. Materials and methods

2.1 Material

Sulcotrione (MW=328.77 g.mol⁻¹; pKa = 3.13; boiling point 574.5°C at 760 mmHg) was purchased from Riedel de Haën, Pestanal®, Saint-Quentin Fallavier, France. CMBA was purchased from Apollo scientific limited, Denton, Manchester, UK. Water was purified using a Millipore Milli-Q system (Millipore αQ, resistivity 18 MΩ.cm, DOC < 0.1 mg.L⁻¹). Acetonitrile was a chromasolv[®] solvent (99 %) provided by Sigma-Aldrich.

2.1 Irradiation conditions

Sulcotrione solutions (2×10⁻⁴ M) prepared in Milli-Q water at pH 2 were irradiated in a Suntest CPS photosimulator (Atlas). A 500 Wm⁻² surface energy was used to simulate the sunlight average intensity received in June in France. The light intensity emitted by the xenon lamp within the wavelength range 290–420 nm was measured using a radiometer QE65000 from Ocean optics. The internal temperature was maintained at approximately 35 ± 2°C with cooled water (15°C) flowing through the bottom of the sample holder with an air cooling system. Sulcotrione (200 mL) was irradiated in a 600 mL glass beaker reactor. The pH 2 was chosen for two reasons. It accelerates the sulcotrione photolysis. The photoproducts distribution in these conditions is close to those obtained when sulcotrione is irradiated as a dry powder on wax films mimicking the surface of leaves. After irradiation, the sulcotrione solutions were analyzed by HPLC to determine the concentrations of Sulcotrione, CMBA and XDD.

XDD was produced by irradiating 60 mg of sulcotrione in 100mL of acetonitrile until complete disappearance of sulcotrione. The irradiation was conducted in a device equipped with six fluorescent tubes (TLAD 15W05 Philips, Eindhoven, The Netherlands) emitting between 290 and 450 nm. The complete conversion of sulcotrione into XDD was checked by HPLC analysis. Acetonitrile was removed by evaporation using a rotavapor. XDD powder was further solubilized in ultrapure water for *Allium cepa* test treatments.

HPLC-UV analyses were carried out at room temperature using a photodiode array detector chromatograph coupled with a reverse phase column (HSS T3 1.8 μm, C₁₈, 2.1× 100 mm, Waters). A flow rate of 0.5 mL.min⁻¹ was used for all analyses. The gradient consisted of

a mixture of 25 % acetonitrile and 75 % water (acidified with formic acid, pH 2.5). After 1 min, the proportion of acetone was linearly increased to 50 % within 9 min. In order to monitor chromatographic separation of sulcotrione and its photoproducts, the detection wavelength was set at 284 and 243 nm. At pH 2.5, molar absorption coefficients are 5500 mol⁻¹.L.cm⁻¹, 27300 mol⁻¹.L.cm⁻¹, and 12000 mol⁻¹.L.cm⁻¹ for CMBA, XDD and sulcotrione, respectively.

2.2. Plant assay system

Bulbs of onion (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) were long-half traditional shallot, 24-44 caliber class 1, Bretagne origin. Pink shallots were “Jersey” variety and were provided by organic agriculture. Root tip cells of *Allium cepa* (2n=16) were used as test system and irradiated sulcotrione, CMBA and XDD as test substances. Healthy bulbs were put in small jars of 40 ml with basal ends dipping in ultrapure water and in darkroom at room temperature (25°C ± 2°C). When new roots were grown to 1-2 cm length, they were washed and used. Roots of *Allium sp.* were treated with irradiated sulcotrione or concentration ranges of CMBA or XDD. All chemical treatments were done in 25 mM phosphate buffer at pH 6.8 in order to neutralize solutions. Negative control was done in phosphate buffer and ethyl methanesulfonate (100mg/L) (Fluka) was used as positive control. Experiments were conducted for 48 h at room temperature 25 ± 1°C in darkness.

2.3. Cytotoxicity and genotoxicity tests

Excised root tips were fixed for 24 h in Clarke's solution (ethanol 99 % and glacial acetic acid 3:1) and then stored in 70 % ethanol at 4°C. Root tips were hydrolysed with 1N HCl for 5 min and incubated in acetic-orcein (1 %) for at least 30 min. Root tips were then squashed in 45% acetic-acid on slides and examined with a microscope Olympus. 3 to 5 bulbs were tested for each concentration of pure or irradiated treatment. 6 to 8 roots were examined separately for each bulb. The analysis of the mitotic index was done in random fields (≈0.2 mm²). An average of 500 cells was scored from each different root to get a total of 3000 cells for one bulb. Each mitotic index (MI) was calculated from the number of dividing cells / total number of cells x 100. Chromosome aberrations, i.e. chromatin bridges, stickiness, stars, laggard, vagrant chromosome and fragments, were characterized in anaphase and telophase cells. All anaphase and telophase cells were taken in account in the

whole meristem of each root. Only roots with at least 20 anaphases and telophases were considered for the study. Chromosomal abnormality frequency was calculated from the number of aberrant cells / Anaphase and Telophase cells x100.

All experiments were performed in triplicate and repeated at least once. Each sample was encoded by another researcher in order to not influence the second one for determination of treatment genotoxicity.

2.4. Statistical analysis

Data from each treatment between each concentration were compared using one way ANOVA analysis and Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test and correlated with JMP 10 software.

3. Results

3.1 Photodegradation sulcotrione kinetics

Photodegradation experiments were conducted with two purposes. First, we wanted to obtain irradiated solutions of sulcotrione showing different concentrations of residual sulcotrione and photoproducts. For this, sulcotrione was irradiated in acidic water for 40, 90, 150 and 210 min. The evolution of sulcotrione, CMBA and XDD concentrations as obtained by HPLC are given in Fig. 1A. These solutions were then used in the different tests. Second, we needed to get XDD as a pure compound to test it separately. XDD could be successfully synthesized by irradiating sulcotrione in pure acetonitrile. Indeed, in these conditions, photohydrolysis of sulcotrione does not occur, therefore CMBA is not produced. Only photocyclization takes place and XDD is the unique photoproduct. *Allium cepa* tests were done on all these samples: irradiated solutions at different irradiation times, pure CMBA and pure XDD. HPLC analyses were done after 48h of treatment with *Allium cepa* roots to determine molecules stability. CMBA and sulcotrione are not affected by the contact with *Allium cepa* and are stable all along the treatment. However, XDD is degraded during the treatment and new by-products are observed. After 48h of treatment around 20% of XDD are degraded. Results of XDD treatment are expressed with XDD initial concentration.

Firstly, solutions obtained after different time of sulcotrione irradiation were tested. Mitotic index and anomaly frequencies were evaluated, and results are given in Fig. 1B, 1C.

Presence of c-mitosis was also calculated in each sample (Fig. 1D). The degradation of sulcotrione was correlated to decrease of mitotic index, together with anomaly and c-mitosis frequency increases.

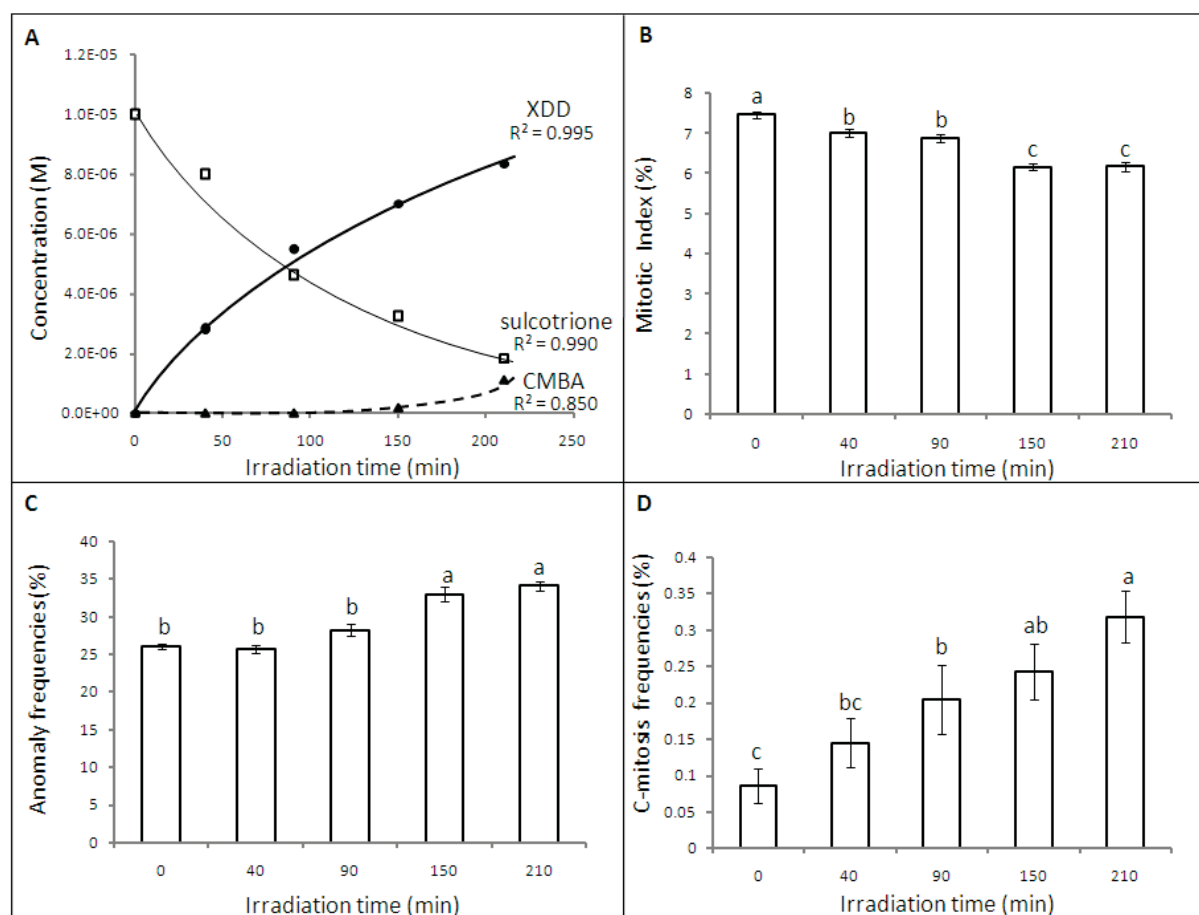


Figure 1. Analysis of sulcotrione photodegradation kinetics. **(A)** Concentrations of CMBA (▲) and XDD (●) during 210 min of photodegradation of sulcotrione solution (1×10^{-5} M) (□) determined by HPLC analyses (detection at 284 and 243 nm). Sulcotrione, XDD and CMBA concentrations follow Quadratic, Michaelis Menten and exponential function respectively, R^2 are indicated for each regression curve. Mitotic index **(B)**, anomaly frequencies **(C)** and C-mitosis frequencies **(D)** were evaluated in root tips cells after 48 h treatment with sulcotrione solution after different time (0, 40, 90, 150, 210 min) of UV degradation (290–420 nm). Data represent an average (\pm SE) of 3 bulbs. The results of Tukey HSD all-pairwise comparisons test are indicated by different letters where values differ significantly at $p < 0.05$.

3.2 Mitotic Index

The cytotoxic effects of CMBA and XDD compounds were investigated on *Allium* root meristematic cells at different concentrations (Fig. 2). MI was cytologically determined after 48h treatment. Mitotic index (MI) of *Allium* root tips incubated in ultrapure water or in 100 mg/L ethyl methane sulfonate were $10.0 \% \pm 0.2$ and $6.8 \% \pm 0.2$ respectively. Ethyl methane sulfonate treatment, positive control, significantly decreased the MI in root meristems as compared to negative control (data not shown).

Mitotic index significantly decreased with enhanced CMBA concentrations from 1×10^{-8} M to 5×10^{-5} M with a minimum of $6.9 \% \pm 0.1$ mitosis cells at the highest concentration (Fig. 2). XDD compound decreased mitotic index from 5×10^{-9} M to 5×10^{-5} M and showed the lowest MI ($3.1 \% \pm 0.3$) for the highest XDD concentration.

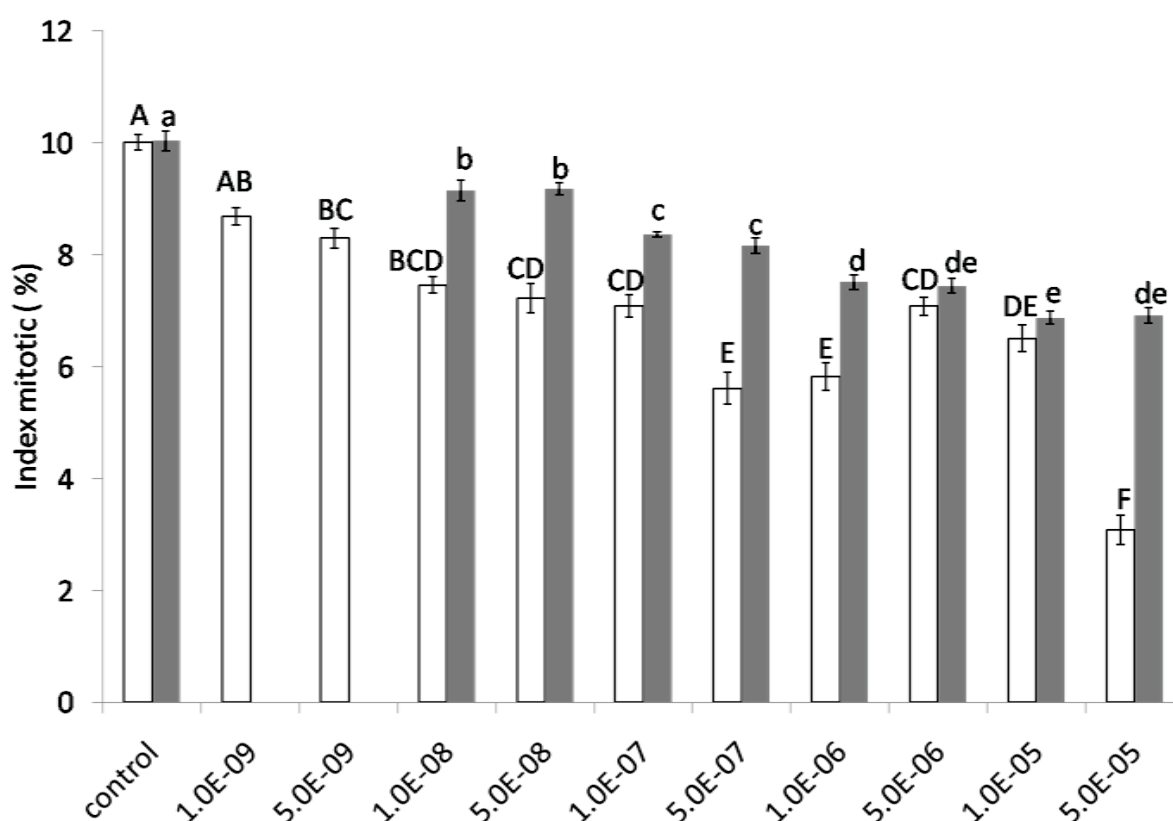


Figure 2. Mitotic Index (%) of root tips cells after 48 h treatment of CMBA (black bar) and XDD (white bar) are shown against different concentrations of these compounds. Data represent an average (\pm SE) of 3–5 bulbs. The results of Tukey HSD all-pairwise comparisons test are indicated by different letters where values differ significantly at $p < 0.05$. CMBA and XDD homogenous groups are shown in lowercase and uppercase letter respectively.

Therefore, both CMBA and XDD treatments decreased MI compared to the negative control and was dose-dependent decreased in *Allium* root tips. MI differences between these compound treatments suggested a greater cytotoxicity with XDD than with CMBA treatments. Furthermore, a slight MI increase was observed using 5×10^{-6} M XDD then indicating a stimulation of cell division or an inhibition of toxicity for such a concentration.

3.3 Chromosomal Aberrations

We looked for aberration in chromosomes morphology in *Allium* root tips exposed to CMBA and XDD. Six types of chromosome aberrations i.e. stickiness, vagrant chromosomes, stars, laggards, bridges and fragments (Fig. 3A) were recorded in anaphase-telophase cells.

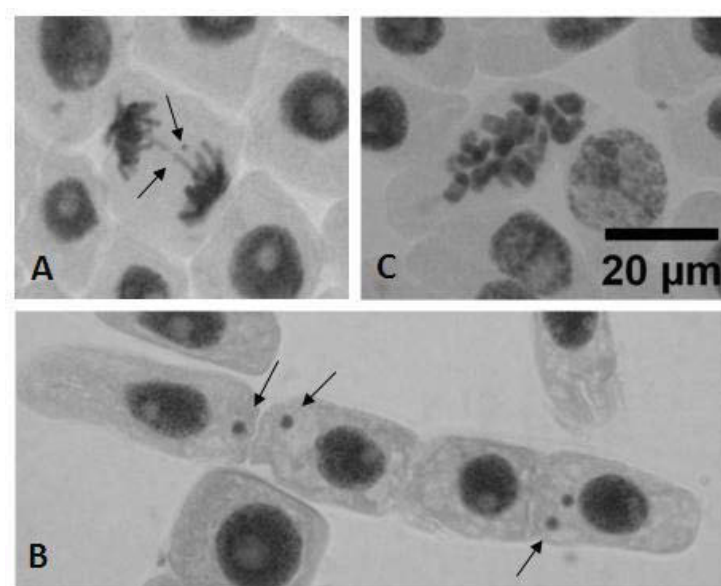


Figure 3. Chromosomal aberrations in *Allium cepa* root tip meristem cells visualized with light microscopy. (a) Chromatid bridge and fragment, (b) Micronuclei, (c) C-mitosis.

Chromosome aberrations in anaphase and telophase mitosis cells were quantified in *Allium* root tips treated for 48h with pure CMBA and XDD, both tested at different concentrations (Fig. 4). Control experiments showed $10.5 \% \pm 0.4$ chromosomal abnormality

frequency in anaphase and telophase mitotic cells. Ethyl methane sulfonate (positive control) induced $16.7 \% \pm 1.1$ of anomaly frequencies.

Cell frequency with abnormal chromosomes increased with CMBA or XDD application rates, from 1×10^{-5} M and 1×10^{-9} M respectively. The highest concentration (5×10^{-5} M) of the CMBA and XDD induced $27.7 \% \pm 0.7$ and $41.5 \% \pm 1.7$ mitotic abnormalities, respectively.

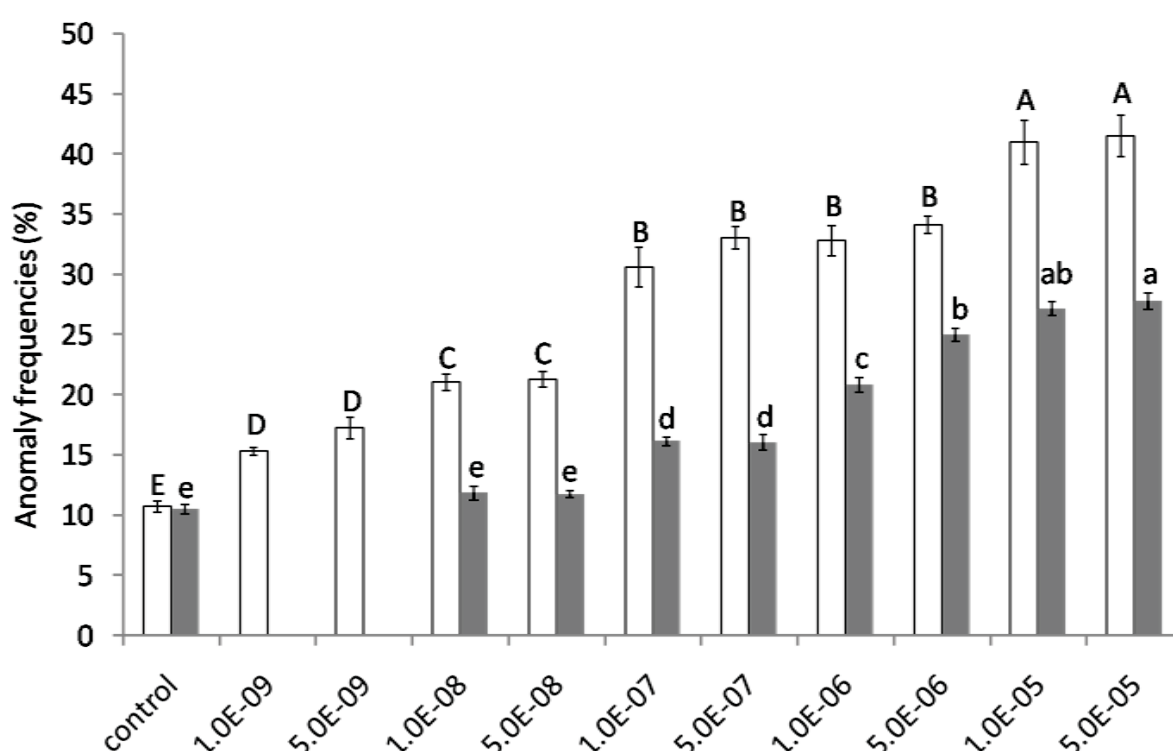


Figure 4. Anomaly frequency means (%) of root tips cells after 48 h treatment of CMBA (black bar) and XDD (white bar) are shown according to different concentrations of these compounds. Data represent an average (\pm SE) of 3–5 bulbs. The results of Tukey HSD all-pairwise comparisons test are indicated by different letters where values differ significantly at $p < 0.05$. CMBA and XDD homogenous groups are shown in lowercase and uppercase letter respectively.

3.4 Micronucleus frequencies

Micronuclei (Fig. 3B) are the result of abnormal mitosis cells which have survived during the mitosis process. Micronucleus frequencies in root tips of negative control or

incubated in ethyl methane sulfonate were $0.02\% \pm 0.01$ and $0.06\% \pm 0.03$ respectively. CMBA and XDD showed two different toxicity patterns of micronucleus frequencies (Fig. 5). CMBA induced a low micronucleus rate even for high concentrations ($0.14\% \pm 0.03$ for 5×10^{-5} M of CMBA), while XDD increased micronucleus ratio from 1×10^{-7} M to 5×10^{-5} M with $0.61\% \pm 0.08$ at the latter concentration.

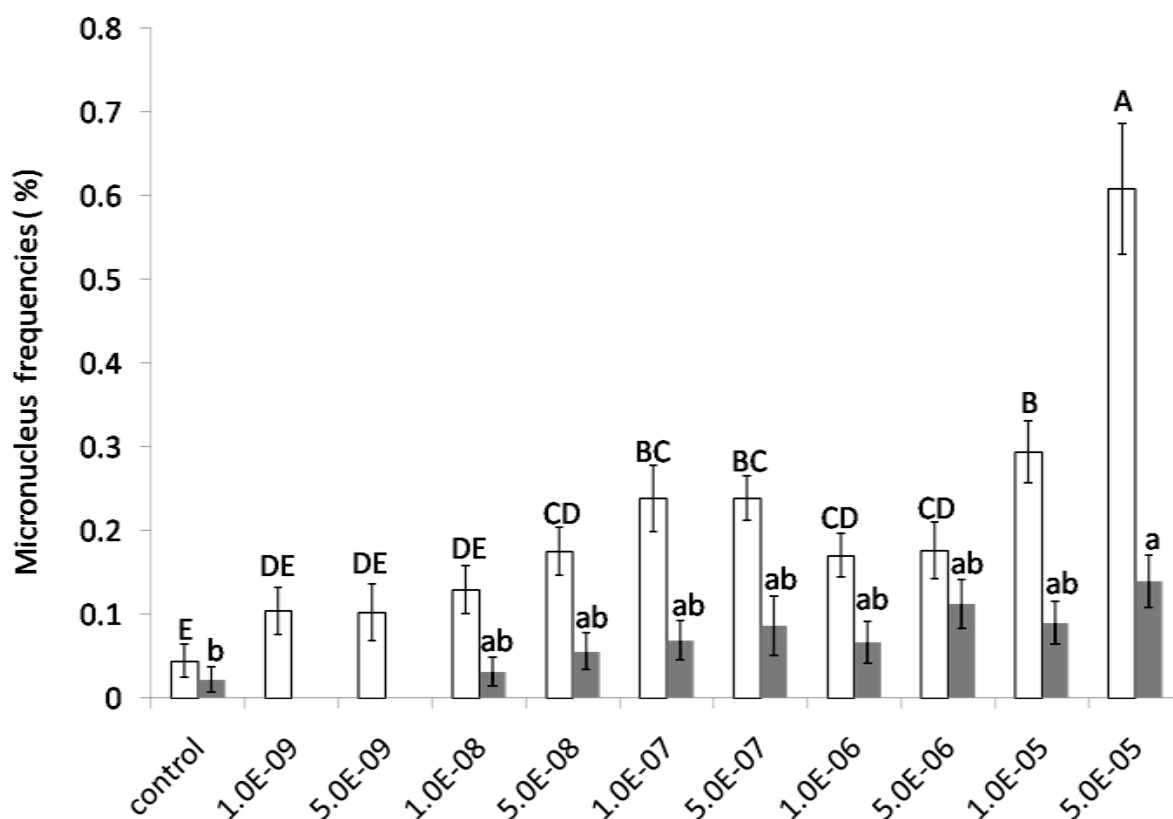


Figure 5. Micronucleus frequency means (%) of root tips cells after 48 h treatment by CMBA (black bar) or XDD (white bar) are shown according to different concentrations of these compounds. Data represent an average (\pm SE) of 3–5 bulbs. Results of Tukey HSD all-pairwise comparisons test are indicated by different letters where values differ significantly at $p < 0.05$. CMBA and XDD homogenous groups are shown in lowercase and uppercase letters respectively.

3.5 C-mitosis frequencies

C-mitoses are chromosomal aberrations due to an inactivation of the spindle (Fig. 3C). When inactivation is ended, chromosomes are contracted and scattered in the cell.

Control treatment did not induce any c-mitosis and EMS treatment induced a low rate of this anomaly type. XDD did not induce any significant c-mitosis in these conditions (Fig. 6). CMBA treatments led to an increase of c-mitosis with concentration from 1×10^{-7} M to 5×10^{-5} M and abnormality frequencies were increased from 0.23 % \pm 0.04 to 0.95 % \pm 0.08 respectively. C-mitosis anomaly seems to be specific to the treatment type. In our experimental conditions, CMBA was the only compound that induced such an anomaly type.

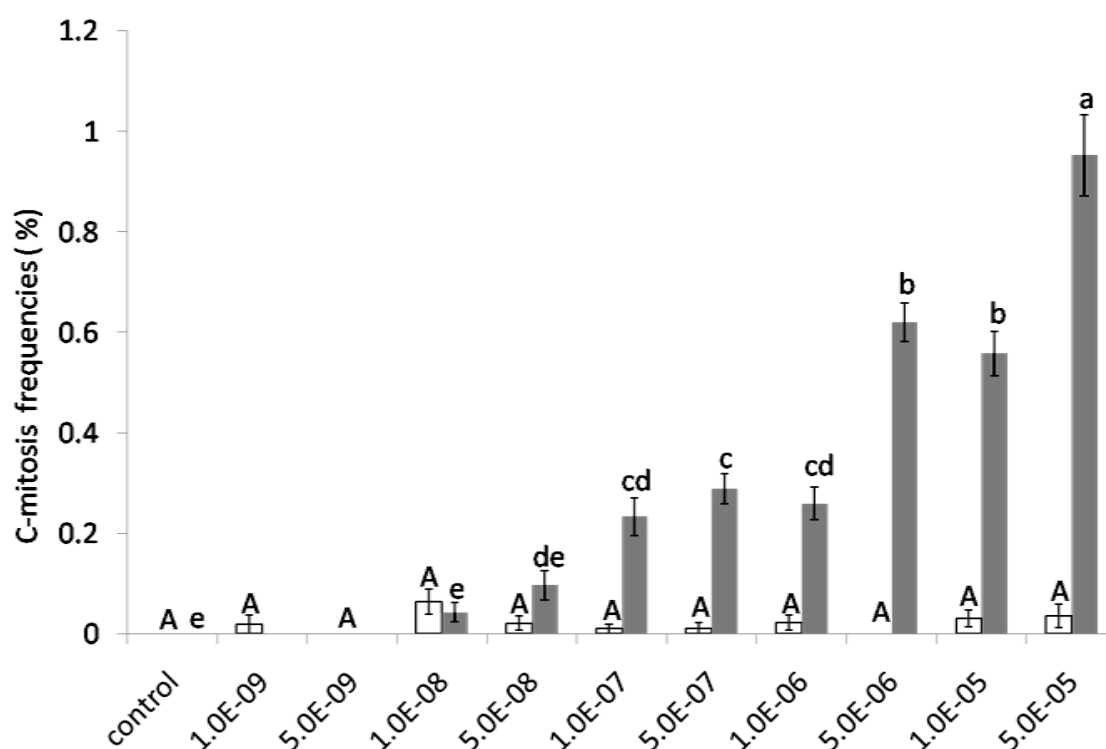


Figure 6. C-Mitosis frequencies of root tips cells after 48 h treatment of CMBA (black bar) and XDD (white bar) are shown against different concentrations of these compounds. Data represent an average (\pm SE) of 3–5 bulbs. Results of Tukey HSD all-pairwise comparisons test are indicated by different letters when values significantly differ at $p < 0.05$. CMBA and XDD homogenous groups are shown in lowercase and uppercase letter respectively.

4. Discussion

Previous works on irradiated sulcotrione have shown a dose dependent cytotoxicity and genotoxicity in *Allium cepa* root meristems [17]. These results were confirmed by irradiation kinetics of sulcotrione in Suntest. In these conditions more sulcotrione was photodegraded and higher was the toxicity. Studies of Wiszniewski *et al* [16] also showed an

increase in toxicity towards *Vibrio fischeri* bacteria along with increase of irradiation period. Moreover we observed an increase rate of c-mitosis in *Allium cepa* meristem along with the highest degraded sulcotrione solution. This suggests that degradation products enhanced microtubule disruption whereas sulcotrione did not. Genotoxic effect of sulcotrione previously described [18] could be triggered by oxidative stress, leading to generation of free radicals and alterations in antioxidative or free radical scavenging enzyme systems [19–21]. We show that degradation of sulcotrione was correlated to decrease of mitotic index, and to increase of anomaly and c-mitosis frequencies. Sulcotrione solution can be degraded in two major products using polychromatic radiation influence. 1H-xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl (XDD) and 2-chloro-4-methylsulfonyl-benzoic acid (CMBA) were tested separately in solution in *Allium cepa* test. Mitotic index significantly decreased with increasing XDD and CMBA concentrations. Cell frequency with abnormal chromosomes increased with CMBA or XDD application rates. In contrast, CMBA induced a low micronucleus rate even for high concentrations while XDD increased micronucleus ratio. In comparison with our previous study [17] XDD is shown more genotoxic than sulcotrione and can reach 40% of anomaly frequencies whereas sulcotrione stabilized near 25% of anomalies for 5×10^{-5} M treatment. Therefore, CMBA seems to have toxicity close to that of sulcotrione, but XDD is shown more harmful. Degradation products can have higher toxicities than parent compound with sometimes longer half-life. This result was previously demonstrated with other active ingredients like alachlor and metolachlor [22].

Moreover, CMBA and XDD have different toxicity patterns. CMBA increased amount of c-mitosis whereas XDD promoted micronucleus emergence (Fig. 4 and 5). These results showed that toxicity was dependent of molecule structure, leading to differences between parent and degraded molecule. Since CMBA and XDD have not the same chemical structure, these two molecules could affect different biological targets. It brings two different toxicity mechanisms which trigger abnormal cell morphology. This result shows the importance of cell observation in such a study to enhance toxic compound characterization.

Actually, thirteen products were identified during all degradation processes for sulcotrione [23]. Among them, benzoic acid by-products appeared more stable to photolysis. On the other hand, XDD could also be degraded in aqueous solution [15] but toxic impact of these new by-products remain unknown. Work is in progress to better understanding the

degradation of XDD in water and to determine the impact of these new by-products on environment.

5. Conclusions.

Cell frequency with abnormal chromosomes increased with CMBA or XDD application rates. In contrast, differences were observed between CMBA and XDD for micronucleus ratio and for C-mitoses. Degradation of a parent molecule can produce several by-products with their own chemical structure according to pathway. Each by-product can induce different toxic effects which lead to different environmental impacts. Pesticide by-products monitoring become greater for environmental contamination evaluations.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Europe (FEDER) and Auvergne Region Council. We thank Céline Sac, Dominique Marcon and Margot Stawinoga for their skillful assistance.

References

- [1] J.S. Kim, T.J. Kim, O.K. Kwon, K.Y. Cho, Mechanism of action of sulcotrione, a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor, in developed plant tissues, *Photosynthetica*. 40 (2002) 541–545.
- [2] C. Calvayrac, F. Martin-Laurent, A. Faveaux, N. Picault, O. Panaud, C.-M. Coste, H. Chaabane, J.-F. Cooper, Isolation and characterisation of a bacterial strain degrading the herbicide sulcotrione from an agricultural soil., *Pest Manag. Sci.* 68 (2012) 340–7.
- [3] R. Cherrier, C. Perrin-Ganier, M. Schiavon, Degradation of sulcotrione in a brown soil amended with various organic matters, *Agronomie*. 24 (2004) 29–33.
- [4] R. Cherrier, A. Boivin, C. Perrin-Ganier, M. Schiavon, Sulcotrione versus atrazine transport and degradation in soil columns, *Pest Manag. Sci.* 61 (2005) 899–904.
- [5] A. Schulz, O. Ort, P. Beyer, H. Kleinig, SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase., *Febs Lett.* 318 (1993) 162–166.
- [6] J. Secor, Inhibition of barnyardgrass 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by Sulcotrione, *Plant Physiol.* 106 (1994) 1429–1433.

- [7] T. Soeda, T. Uchida, Inhibition of pigment synthesis by 1,3-dimethyl-4-(2,4-dichlorobenzoyl)-5-hydroxypyrazole, Norflurazon, and new herbicidal compounds in radish and flatsedge plants, *Pestic. Biochem. Physiol.* 29 (1987) 35–42.
- [8] D.J. Mayonado, K.K. Hatzios, D.M. Orcutt, H.P. Wilson, Evaluation of the mechanism of action of the bleaching herbicide sc-0051 by HPLC analysis, *Pestic. Biochem. Physiol.* 35 (1989) 138–145.
- [9] H. Chaabane, J.-F.F. Cooper, L. Azouzi, C.-M.M. Coste, Influence of soil properties on the adsorption-desorption of sulcotrione and its hydrolysis metabolites on various soils, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4091–4095.
- [10] H. Chaabane, E. Vulliet, C. Calvayrac, C. Coste, J. Cooper, Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils, *Pest Manag. Sci.* 64 (2008) 86–93.
- [11] A. ter Halle, D. Drncova, C. Richard, Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 2989–2995.
- [12] A. ter Halle, J. Wiszniowski, A. Hitmi, G. Ledoigt, F. Bonnemoy, J.-L.L. Bonnet, J. Bohatier, C. Richard, Photolysis of the herbicide sulcotrione: formation of a major photoproduct and its toxicity evaluation, *Pest Manag. Sci.* 65 (2009) 14–18.
- [13] J. Wiszniowski, A. Ter Halle, C. Richard, A. Hitmi, G. Ledoigt, Photodegradation product of sulcotrione and the physiological response of maize (*Zea mays*) and white mustard (*Sinapis alba*), *Chemosphere.* 74 (2009) 1224–1230.
- [14] H. Chaabane, E. Vulliet, F. Joux, F. Lantoine, P. Conan, J.-F. Cooper, C.-M. Coste, Photodegradation of sulcotrione in various aquatic environments and toxicity of its photoproducts for some marine micro-organisms., *Water Res.* 41 (2007) 1781–9.
- [15] C. Calvayrac, N. Bontemps, A. Nougä-Bissoué, S. Romdhane, C.-M. Coste, J.-F. Cooper, Photolysis of tembotrione and its main by-products under extreme artificial conditions: Comparison with another beta-triketone herbicide, *Sci. Total Environ.* 452-453 (2013) 227–232.
- [16] J. Wiszniowski, A. Ter Halle, C. Richard, F. Bonnemoy, J. Bohatier, Toxicity of sulcotrione photoproducts mixture towards *Vibrio fischeri* in the aquatic environment, *Arch. Environ. Prot.* 37 (2011) 15–23.
- [17] E. Goujon, C. Sta, A. Trivella, P. Goupil, C. Richard, G. Ledoigt, Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem., *Pestic. Biochem. Physiol.* 113C (2014) 47–54.
- [18] C. Sta, G. Ledoigt, E. Ferjani, P. Goupil, Exposure of *Vicia faba* to sulcotrione pesticide induced genotoxicity, *Pestic. Biochem. Physiol.* 103 (2012) 9–14.
- [19] A.G. Doulis, J.L. Donahue, R.G. Alscher, Differential responses to paraquat-induced oxidative injury in a pea (*Pisum sativum*) protoplast system, *Physiol. Plant.* 102 (1998) 461–471.

- [20] D. Štajner, M. Popović, M. Štajner, Herbicide Induced Oxidative Stress in Lettuce, Beans, Pea Seeds and Leaves, *Biol. Plant.* 47 (2003) 575–579.
- [21] R.M. Chagas, J.A.G. Silveira, R. V Ribeiro, V.A. Vitorello, H. Carrer, Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress, *Pestic. Biochem. Physiol.* 90 (2008) 181–188.
- [22] O. Osano, W. Admiraal, H.J.C. Klammer, D. Pastor, E. a. J. Bleeker, Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*, *Environ. Pollut.* 119 (2002) 195–202.
- [23] M. Jović, D. Manojlović, D. Stanković, B. Dojčinović, B. Obradović, U. Gašić, G. Roglić, Degradation of triketone herbicides, mesotrione and sulcotrione, using advanced oxidation processes, *J. Hazard. Mater.* 260 (2013) 1092–1099.

Chapitre 3: Etude de l'effet des produits de phototransformation de la sulcotrione sur la croissance racinaire.

Lors des chapitres précédents, nous avons analysé l'impact génotoxique des molécules chimiques issues de la phototransformation de la sulcotrione sur les racines d'*Allium cepa*. Ces études ont été effectuées par l'analyse cellulaire des méristèmes racinaires d'*Allium cepa* cultivés en hydroponie. Cette technique est réalisée par un comptage au microscope des cellules en cours de mitose et par l'identification d'anomalies structurales durant ces étapes de division cellulaire. Une étude quantitative au niveau tissulaire est réalisée en mesurant et en comparant la croissance racinaire d'*Allium cepa* cultivé en présence des molécules chimiques à analyser. Cette méthode consiste à mesurer la croissance racinaire des différents bulbes d'*Allium cepa* après 48h de traitement avec les produits de phototransformation. La croissance racinaire résulte de deux phénomènes distincts : la division cellulaire qui permet de renouveler et générer un stock de cellules dans le méristème de la racine et l'élongation cellulaire qui permet aux nouvelles cellules d'acquérir leur taille finale. Si l'une ou l'autre de ces étapes est inhibée, la racine aura une croissance plus faible indiquant une cytotoxicité induite par la molécule testée. Cette technique permet ainsi de réaliser un criblage rapide de molécules potentiellement toxiques.

Les études de croissance ont été conduites sur le modèle *Allium cepa*. Il génère un grand nombre de racines à croissance relativement rapide et homogène. D'après Ma et collaborateurs (1995b) un traitement hydroponique de 48h devrait permettre d'obtenir au minimum deux générations de cellules dans le méristème racinaire. Dans nos études, nous avons cherché à caractériser l'effet des différentes molécules issues de la phototransformation de la sulcotrione (CMBA et XDD) sur la croissance racinaire d'*Allium cepa*.

Dans nos expérimentations, nous avons pu mettre en évidence l'instabilité du composé XDD. Celui-ci n'est pas très stable en milieu aqueux et cette instabilité s'est montrée accrue en présence d'exsudats racinaires. Nous avons donc étudié de façon préliminaire cette réaction et caractériser les produits de transformation avant de procéder aux études biologiques. Ce chapitre se présente en deux parties. La première est consacrée à la synthèse et à l'évolution des solutions de XDD en milieux aqueux. La seconde porte sur les effets des différents mélanges et molécules sur le modèle végétal.

1. Synthèse de XDD et caractérisation de ses produits d'hydrolyse.

1.1. Synthèse de XDD

Sous forme moléculaire, la sulcotrione se phototransforme en 1,9-dione-3,4-dihydro-6-méthylsulfonyl xanthène (XDD) (ter Halle *et al.*, 2009). Cette photocyclisation a été observée en milieu aqueux acide, dans un mélange eau acide/acétonitrile (95 : 5) et en phase solide lorsque la sulcotrione est déposée sur feuilles ou films de cire en solution acide puis séchée (ter Halle *et al.*, 2007). Dans ces conditions, il se forme du CMBA car il y a présence d'eau. En partant de ces données, nous avons établi de nouvelles conditions expérimentales pour préparer XDD par irradiation de la sulcotrione. Nous avons irradié en lumière polychromatique (290 à 450nm) la sulcotrione en solution dans l'acétonitrile pur. La figure 24 montre l'évolution HPLC de la solution au cours de l'irradiation pendant les 6 premières heures. On observe que seul XDD est produit et surtout que cette sélectivité persiste jusqu'à la disparition totale de la sulcotrione. Aucun produit d'hydrolyse tel que le CMBA ou le CHD n'est formé.

La figure 25 donne les concentrations en sulcotrione et en XDD des différents échantillons prélevés au cours de la cinétique d'irradiation. Les calculs de concentrations de la sulcotrione et de XDD sont réalisés en utilisant leurs coefficients d'absorption molaires qui sont respectivement de $12000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $27300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ à pH 2.5 (chapitre 2).

La transformation complète de la sulcotrione est obtenue au bout de 15h d'irradiation (figure 26).

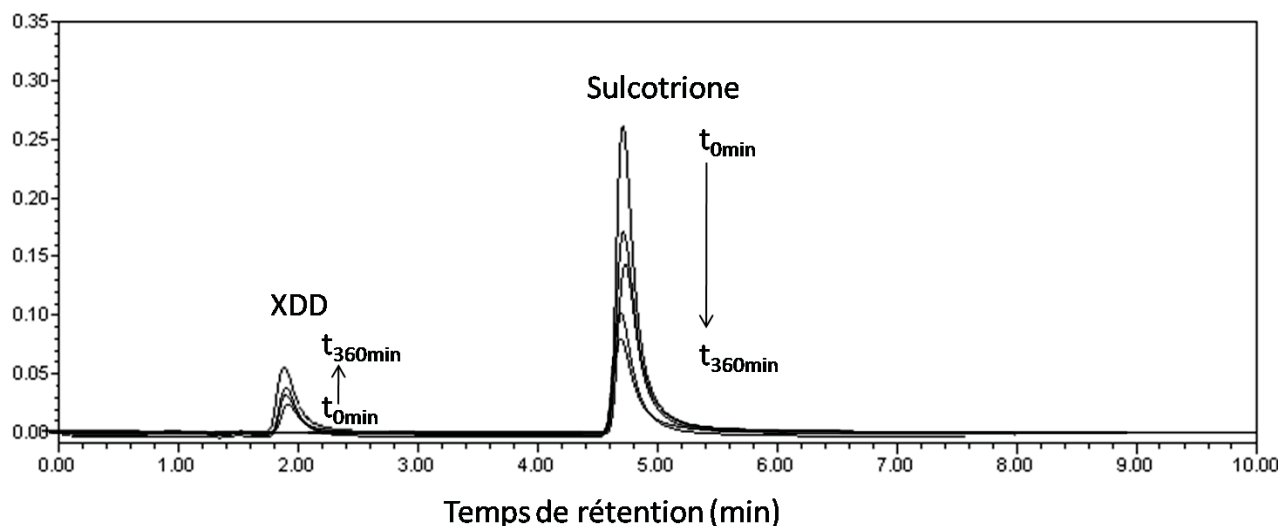


Figure 24 : Chromatogrammes en phase liquide de la sulcotrione au cours de sa photodégradation dans l'acétonitrile. Différents profils HPLC sont superposés pour illustrer la transformation de sulcotrione en XDD à différents temps d'échantillonnages (0min, 90min, 120 min, 240min et 360min d'irradiation)

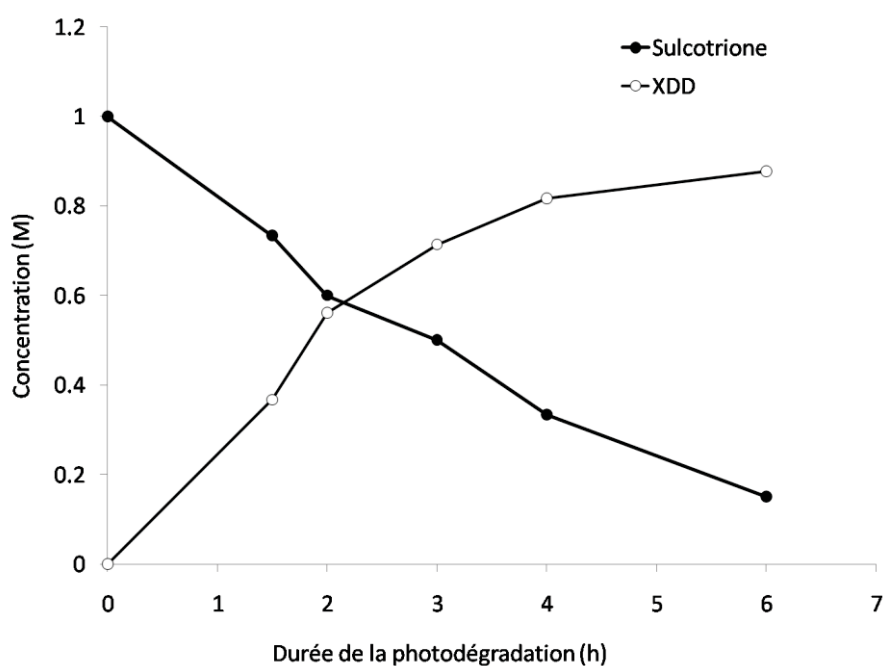


Figure 25 : Cinétique de phototransformation de la sulcotrione en solution d'acétonitrile. Les concentrations en sulcotrione et en XDD sont représentées à différents temps d'échantillonnages (0min, 90min, 120 min, 180 min, 240min et 360min d'irradiation).

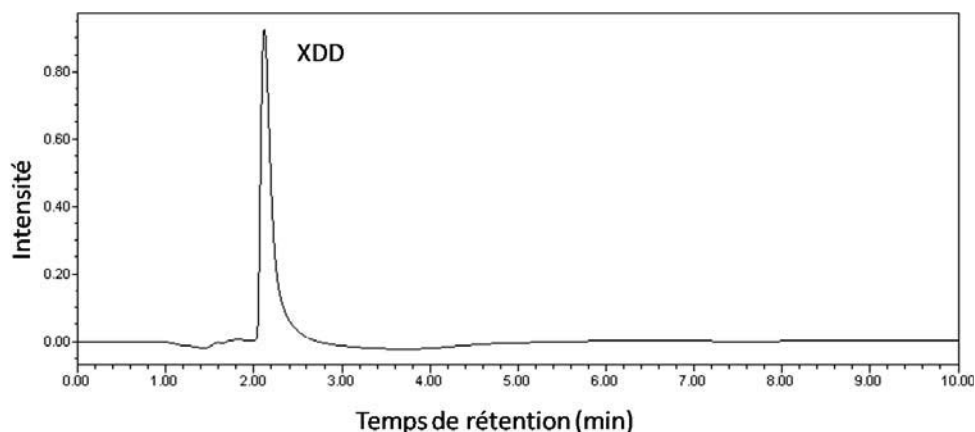


Figure 26 : Chromatogramme en phase liquide d'une solution de sulcotrione dans l'acétonitrile après 15h d'irradiation. Le profil HPLC montre que la sulcotrione est complètement transformée et qu'une seule molécule est produite, le XDD.

1.2. Transformation de XDD

Sous forme de poudre, XDD est parfaitement stable. En revanche dans l'eau tamponnée à pH 7, à l'obscurité et à température ambiante, il se dégrade lentement comme le montre la figure 27. La demi-vie est d'environ 37 jours. Cette vitesse de transformation dans l'eau est modérée. Etant donné que les traitements biologiques durent au minimum 48h en milieu aqueux, il est donc difficile d'envisager un traitement avec exclusivement XDD tout au long d'une expérimentation. De plus, nous avons observé que lorsque la solution de XDD est mélangée à l'exsudat racinaire d'*Allium cepa* sa dégradation devient très rapide avec une demi-vie de 4 à 6 jours. Au bout des 48 h de traitement, il a alors disparu environ 20 % de XDD.

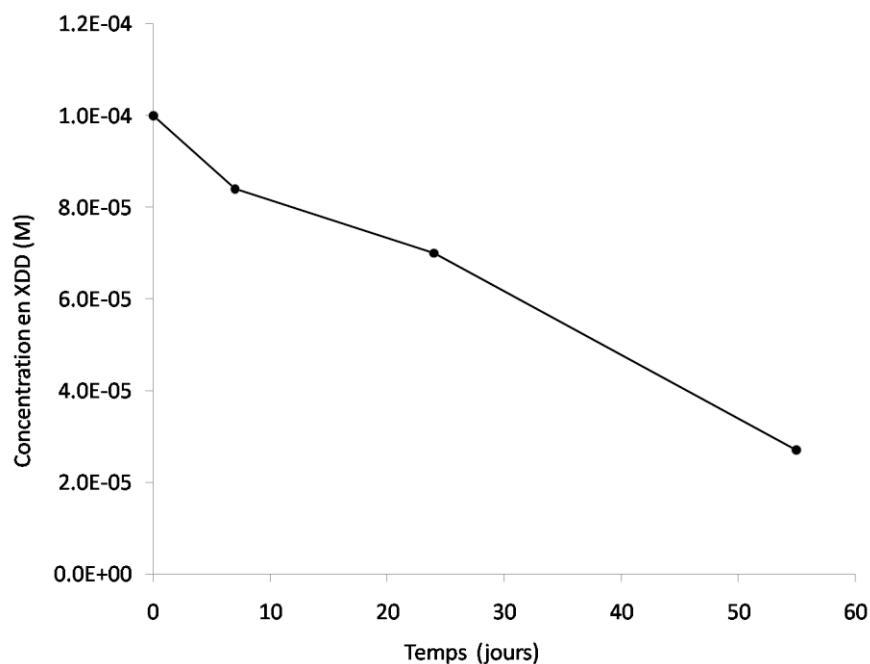


Figure 27 : Cinétique de dégradation de la molécule XDD au cours du temps dans l'eau tamponnée à pH 7, à l'obscurité et à température ambiante.

1.3. Caractérisation des produits de transformation de XDD

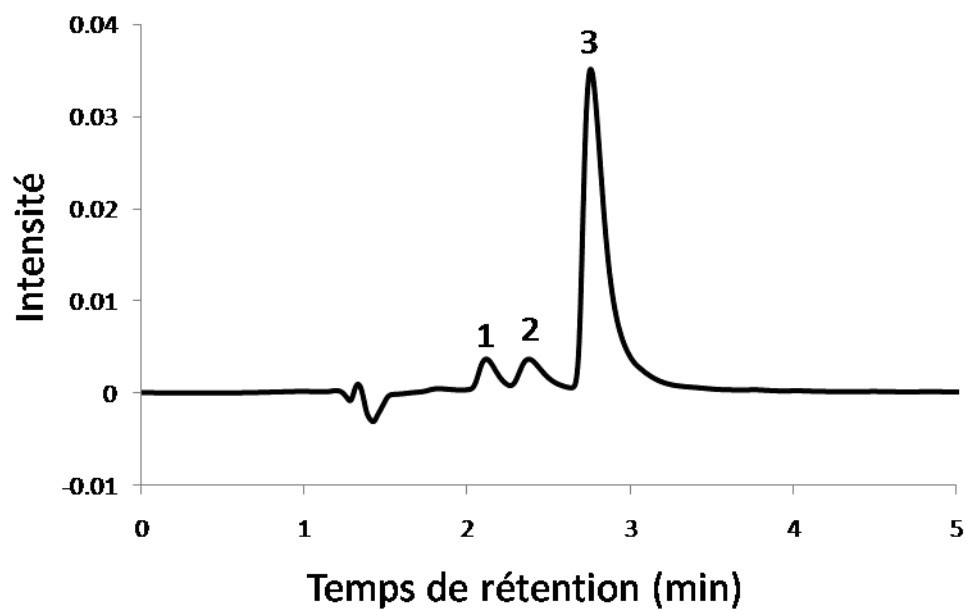
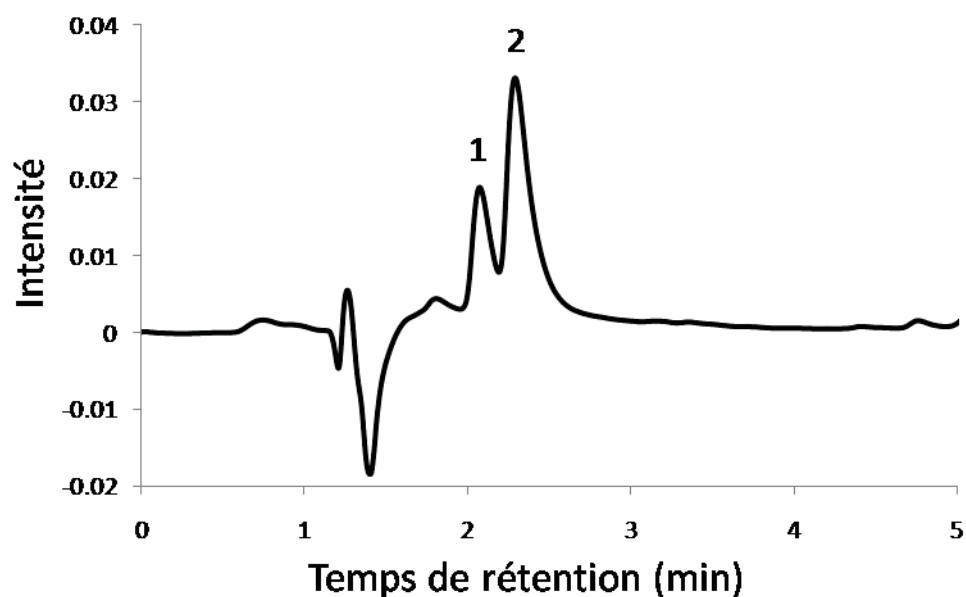


Figure 28 : chromatogramme en phase liquide de XDD à 240nm en cours de dégradation dans de l'eau tamponnée à pH 7, à température ambiante et à l'obscurité au bout de 21 jours.



*Figure 29 : Chromatogramme en phase liquide de XDD à 240nm en cours de dégradation dans de l'eau tamponnée à pH 7 contenant des exsudats racinaires d'*Allium cepa*, à température ambiante et à l'obscurité au bout de 30 jours, XDD a totalement disparu.*

Nous présentons, dans les figures 28 et 29, les chromatogrammes HPLC obtenus après respectivement 21 jours de stockage de la solution de XDD dans l'eau tamponnée ou 30 jours en présence d'exsudats racinaires. Dans l'eau, deux produits (notés 1 et 2) plus polaire que XDD (noté 3) apparaissent. Leurs spectres UV-visible sont présentés dans la figure 30. Le produit 1 présente un maximum d'absorption à 256 nm et aucune absorption au-delà de 300 nm. Le produit 2 présente une bande d'absorption centrée sur 309 nm, il est très fluorescent (par excitation à 280nm). Les spectres d'absorption des produits 1 et 2 sont très différents de celui du XDD indiquant que leurs structures chimiques sont aussi très différentes. Un quatrième produit présentant un temps d'élution nettement plus long a également été observé. Son spectre d'absorption présente quelques analogies avec celui du XDD.

Ces analyses HPLC révèlent que quel que soient les conditions de dégradation (présence ou non d'exsudat racinaire) les produits de dégradation sont les mêmes (notés 1 et 2). Ces composés sont stables et peuvent être stockés plusieurs semaines sans aucune altération.

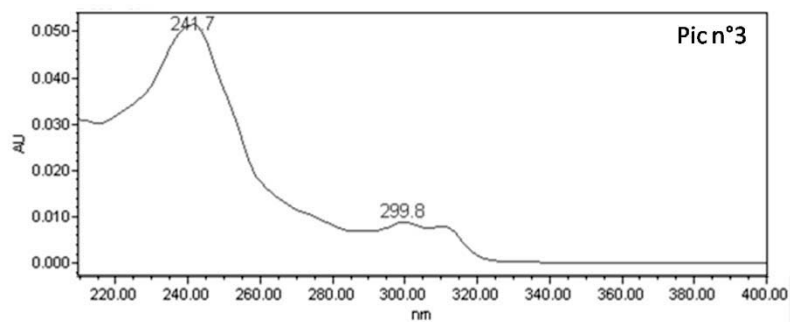
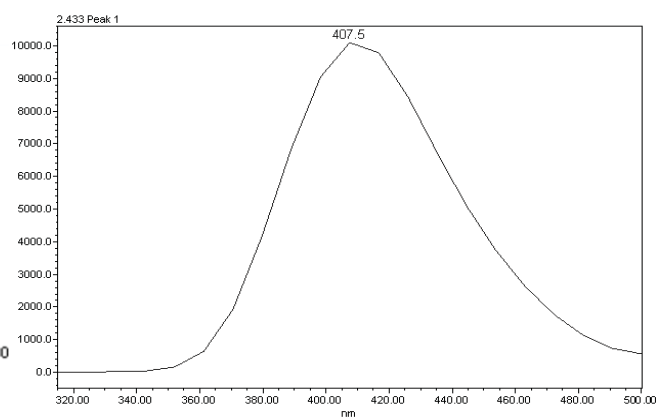
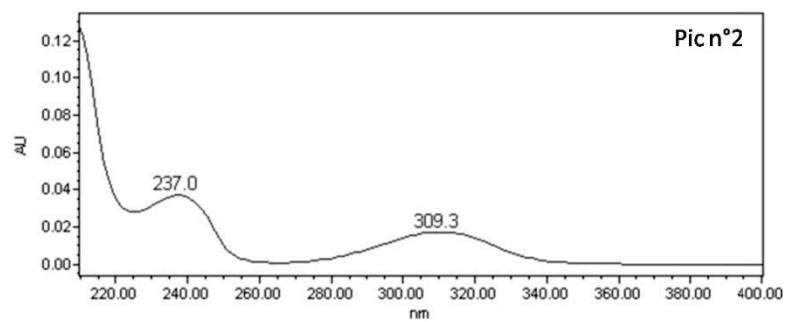
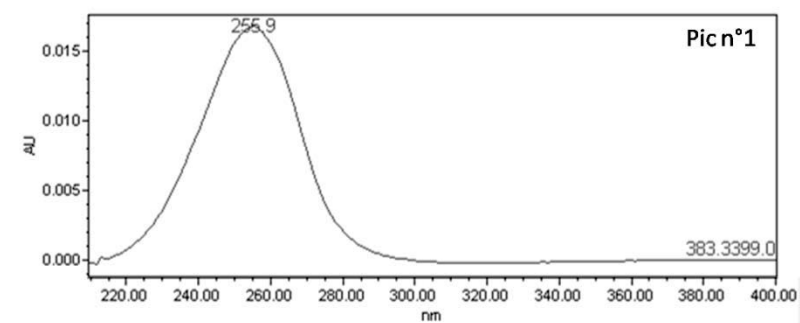


Figure 30 : Spectres d'absorption UV-visible des produits de dégradation de XDD. Le spectre d'émission de fluorescence du produit 2 par excitation à 280nm est donné en complément. Le produit 3 correspond à la molécule XDD

Pour identifier ces composés nous avons réalisé des analyses par spectrométrie de masse sur ces solutions. L'objectif était de séparer les produits de transformation et, grâce à la spectrométrie de masse, de mesurer le rapport m/z de chaque composé. De plus, par fragmentation des différentes molécules, nous pouvons identifier les groupements chimiques qui les composent et ainsi avancer une formule développée en prenant en compte la formule du XDD.

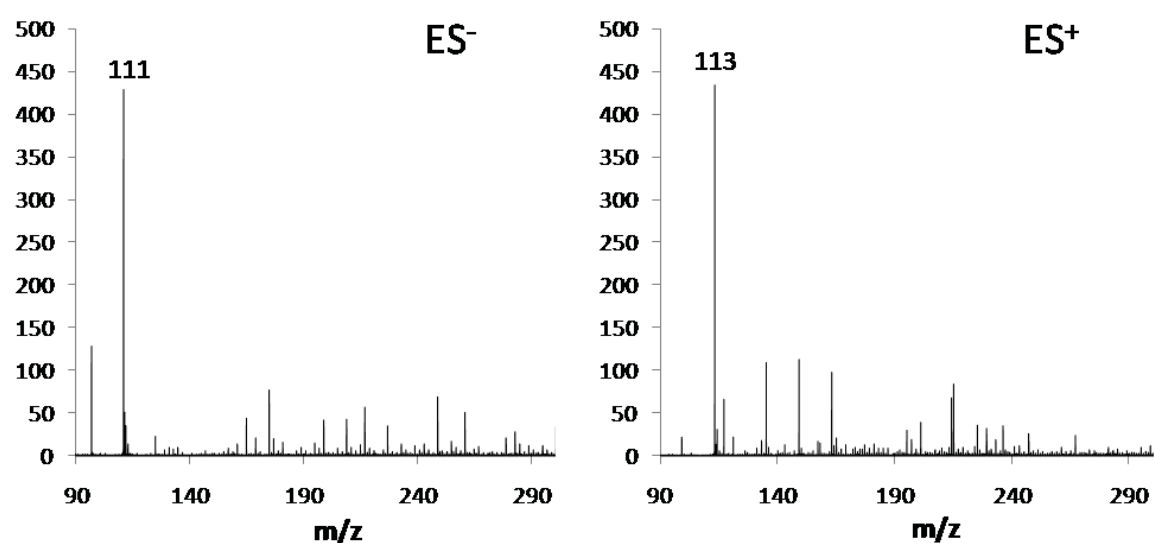


Figure 31 : Spectre de masse correspondant au produit 1 en « Electrospray » négatif (ES⁻) et en « Electrospray » positif (ES⁺).

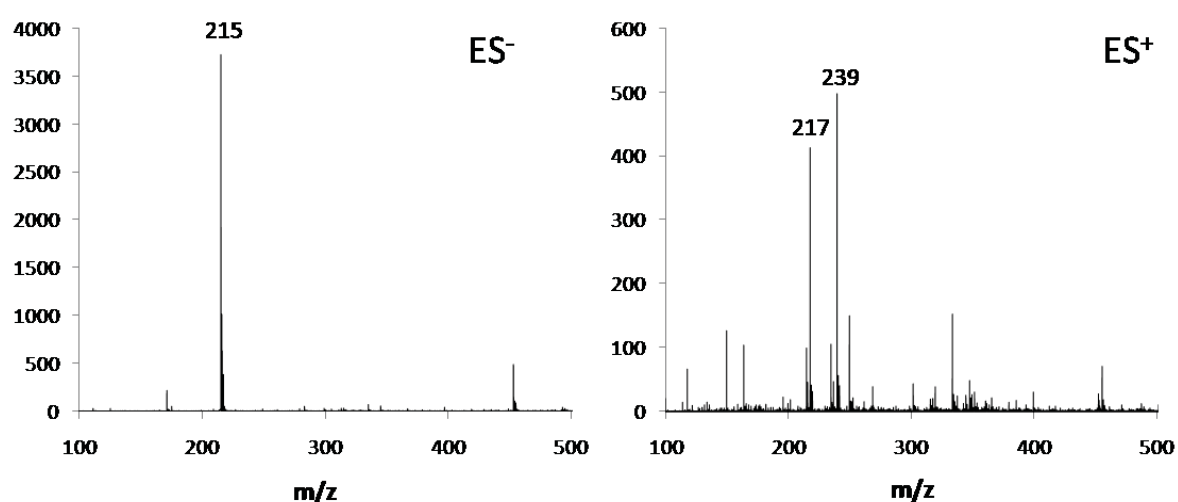
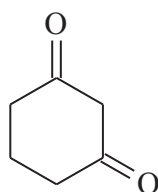


Figure 32 : Spectre de masse correspondant au produit 2 en « Electrospray » négatif (ES⁻) et en « Electrospray » positif (ES⁺).

De façon systématique, les échantillons ont été analysés en mode négatif et en mode positif. L'objectif est double. Certains composés ne sont détectables que dans l'un des modes et il est nécessaire de réaliser les deux. Par ailleurs, si un composé est détectable selon les deux modes, la détection conjointe de $[M+H]^+$ et /ou $[M+Na]^+$ et $[M-H]^-$ confirme qu'il s'agit d'un ion parent et non d'un fragment.

La figure 31 présente les spectres de masse correspondants au produit 1. On obtient $m/z = 111$ en ES^- et 113 en ES^+ . La masse de la molécule recherchée est donc de 112 avec comme formule brute : $C_6H_8O_2$. Cette formule brute est confirmée par la masse exacte en ES . Celle-ci est de 111,0446 alors que l'on trouve expérimentalement 111,0447, soit un écart de 0,9 ppm. Il semble donc que le composé 1 est la 1,3-cyclohexanedione :



La figure 32 présente les spectres de masse correspondants au produit 2. On obtient $m/z = 215$ en ES^- et 217 ou 239 en ES^+ . La masse de la molécule recherchée est donc de 216. La masse exacte en ES^- est de 214,9989, ce qui valide une formule brute du type $C_8H_7O_5S$.

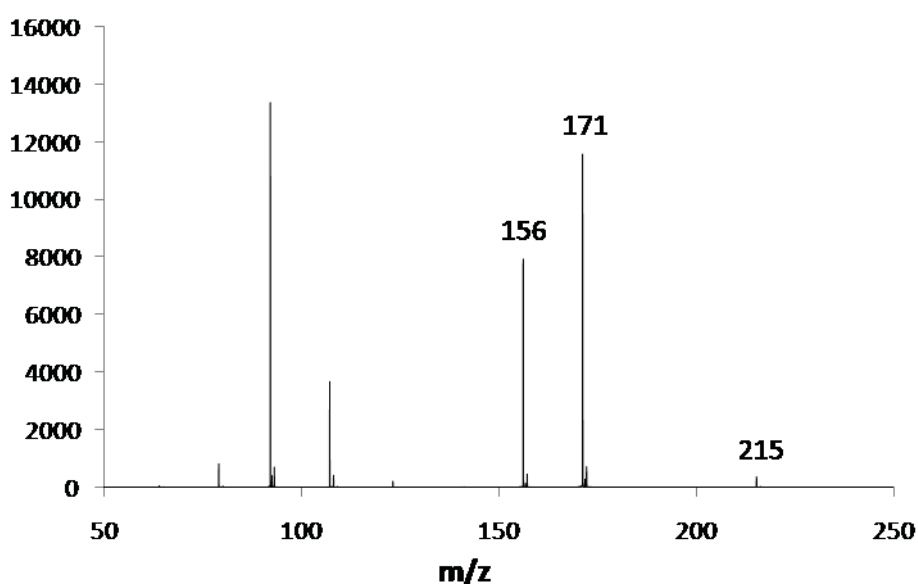


Figure 33 : Spectre de fragmentation correspondant à la molécule de masse 216 (produit 2) en « Electrospray » négatif.

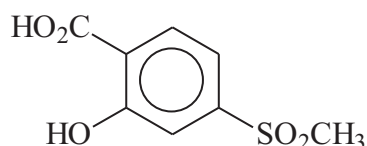
La figure 33 présente les résultats obtenus après fragmentation de l'ion $m/z=215$ en ES^- . Les fragments obtenus nous donnent les indications suivantes :

Le fragment $m/z= 171$ montre que l'ion parent peut perdre 44, soit CO_2 .

Le fragment $m/z= 156$ montre que l'ion parent peut perdre 59, soit CO_2 et CH_3 .

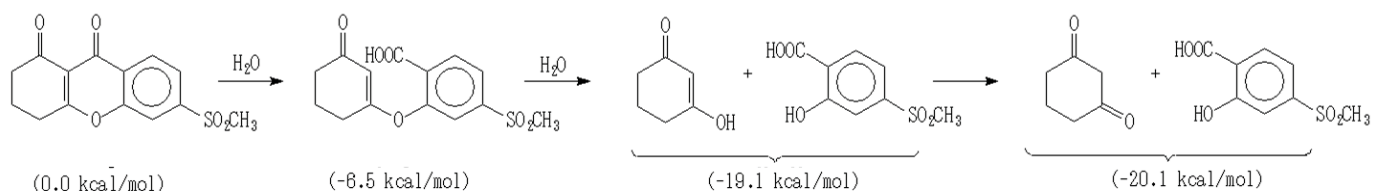
En ES^+ , le fragment $m/z= 137$ montre que l'ion parent peut perdre 80, soit HSO_2CH_3 .

Compte tenu de ces informations, on peut conclure que le composé 2 a conservé le groupement SO_2CH_3 et possède un acide carboxylique. Sa forte fluorescence avec un maximum d'émission à 407nm est en accord avec une structure de type acide salicylique (Miles et Schenk, 1970). En conclusion, nous pouvons proposer pour 2 la structure suivante :



Cette formation de l'acide 2-hydroxy-4-méthylsulfonylbenzoïque (HMBA) a été validée par comparaison avec le composé authentique commercial en comparant les spectres d'absorption UV-visible et de fluorescence et le temps de rétention en HPLC.

La dégradation de XDD en CHD et en HMBA correspond à l'addition de deux molécules d'eau et donc à une double hydrolyse:



La détection en HPLC de produits intermédiaires qui présentent un spectre UV-visible assez proche de celui de XDD suggère que cette hydrolyse se fait par étapes. Des calculs

quantiques seraient cependant nécessaires pour mieux comprendre et expliquer cette réactivité.

Un résultat intéressant et surprenant est que cette hydrolyse est activée biologiquement. En effet, lors de nos différentes expérimentations nous avons pu observer qu'en présence des racines d'*Allium cepa* la transformation de XDD en HMBA et en CHD était nettement accélérée. Les produits étant de même nature nous en avons conclu que les réactions chimiques étaient les mêmes qu'en milieu aqueux et qu'un facteur apporté par les racines favorise cette transformation. Pour savoir si les racines agissent directement en métabolisant le XDD par des systèmes biologiques nous avons analysé en parallèle deux solutions de XDD. L'une de ces solutions a séjourné 48h en présence de racines d'*Allium cepa*. La deuxième solution de XDD est mélangée avec de l'exsudat racinaire qui a été prélevé préalablement après culture d'un bulbe d'*Allium cepa* dans de l'eau distillée. Les deux réactions sont suivies à température ambiante et à l'obscurité. Nous avons observé que les deux solutions étaient dégradées avec une vitesse relativement équivalente et bien plus rapidement qu'une solution de XDD séjournant dans de l'eau tamponnée dans les mêmes conditions. Nous en avons conclu que le facteur accélérant la transformation de XDD n'était pas directement les racines d'*Allium cepa* mais un composé contenu dans l'exsudat racinaire.

D'après la littérature il existe des enzymes végétales pouvant transformer des molécules de type xanthénique (Schmidt et Beerhues, 1997; Schmidt *et al.*, 2000). En effet les molécules de la famille des xanthènes et des xanthones sont des métabolites secondaires connus chez les végétaux. Il serait donc envisageable que de telles enzymes soient excrétées depuis la racine et qu'elles soient capables d'accélérer la transformation de XDD en HMBA et CHD. Une autre hypothèse serait qu'un microorganisme faisant partie de la rhizosphère d'*Allium cepa* soit capable de métaboliser XDD. Il a déjà été observé des mécanismes similaires où des microorganismes spécifiques à l'environnement racinaire d'une plante permettent la transformation des molécules assimilables ou encore une détoxification des sols (Singer *et al.*, 2003). Ce phénomène peut même être poussé jusqu'à la transformation par des procédés enzymatiques du naphthalène en acide salicylique, pour stimuler la résistance de la plante (Yen et Gunsalus, 1982).

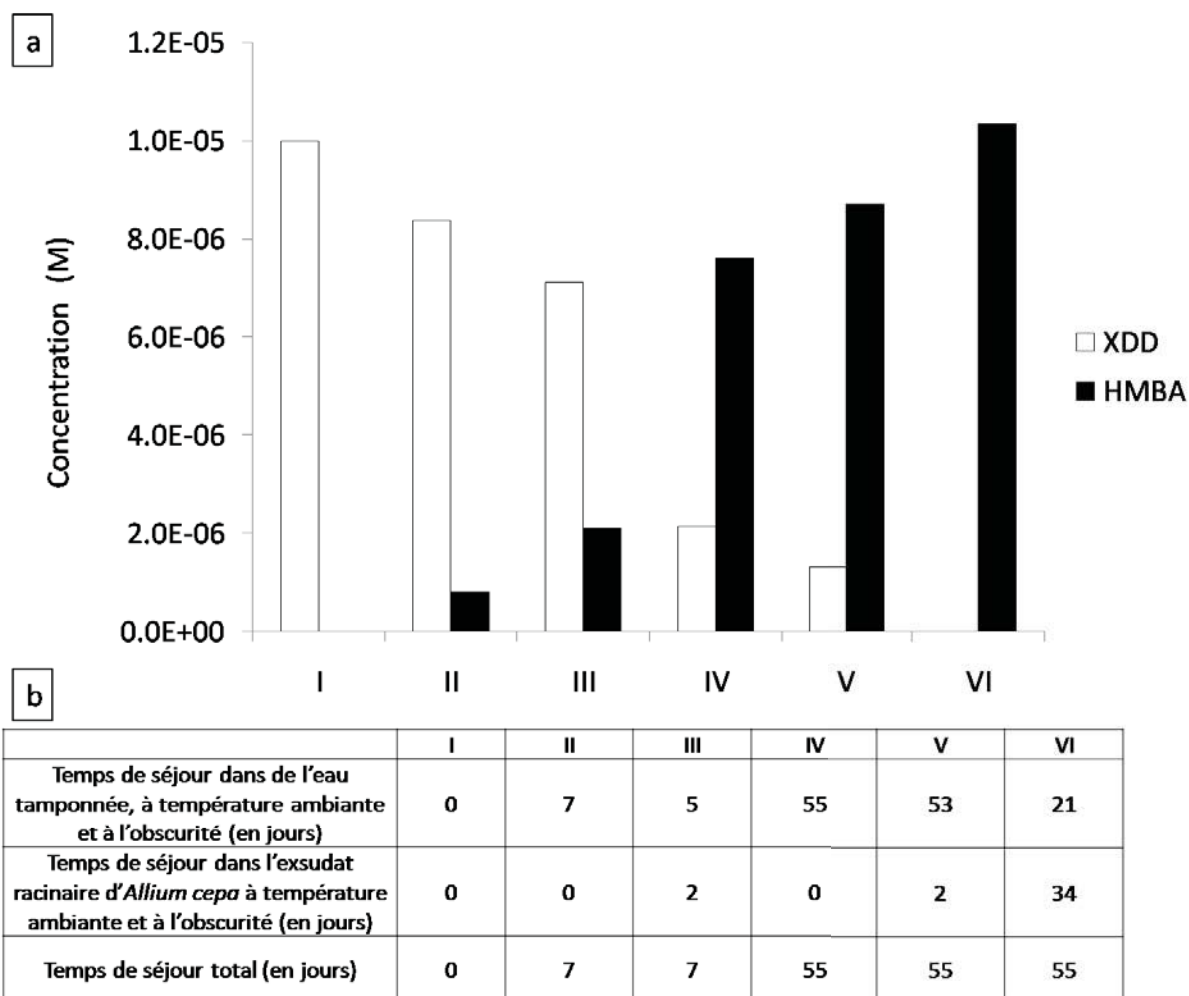
1.4. Calculs des concentrations des produits de dégradation de XDD

Un calcul de la concentration en HMBA au cours de la transformation du XDD a été réalisé par HPLC en utilisant la molécule standard authentique.

La figure 34 présente l'évolution au cours du temps des concentrations en XDD et en HMBA lorsque XDD a séjourné à la fois dans les solutions aqueuses tamponnées pH 7 et dans les solutions d'exsudats racinaires, à température ambiante et à l'obscurité. Les détails expérimentaux sont indiqués dans le tableau joint à la figure 34.

On remarque qu'une mole de XDD (I) va produire une mole de HMBA (VI) et donc que la transformation est équimolaire.

Il apparaît clairement que l'ajout des exsudats racinaires accélère la transformation.

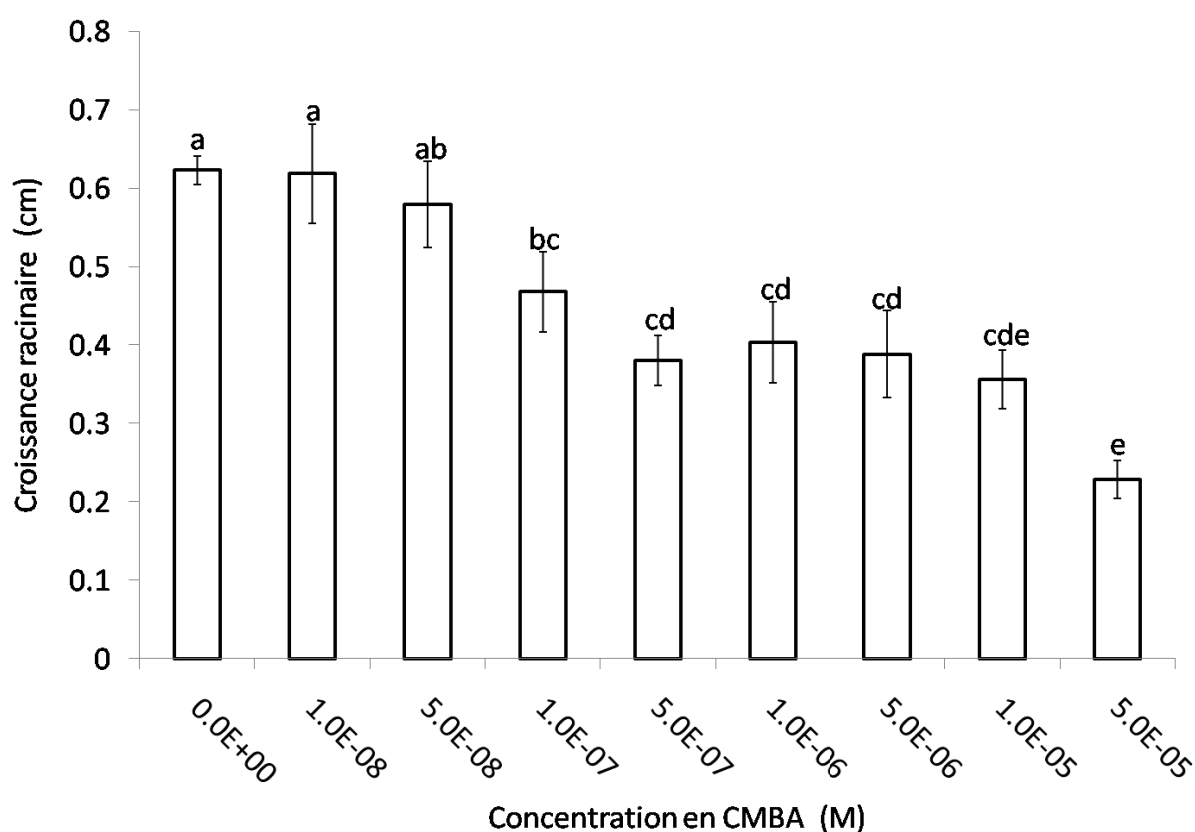


*Figure 34 : Concentrations en XDD et HMBA à différents temps de transformation de XDD. La caractérisation des solutions est réalisée par HPLC et les concentrations en XDD et en HMBA sont données dans la figure (a). La transformation d'une solution de XDD $10^{-5}M$ est obtenue dans les conditions expérimentales décrites dans le tableau (b) soit uniquement en milieu aqueux soit à la fois en milieu aqueux et en présence d'une solution d'exsudat racinaire d'*Allium cepa*.*

2. Effets des différents mélanges et des molécules seules sur les modèles végétaux.

2.1. Effets de CMBA sur la croissance racinaire d'*Allium Cepa*

Dans cette étude nous avons gardé les paramètres méthodologiques énoncés dans le chapitre 2. Le CMBA est utilisée sur une gamme de concentration allant de 10^{-8} à 5.10^{-5} M en culture hydroponique de 48h. La figure 35 illustre les croissances racinaires moyennes des bulbes d'*Allium cepa* traités en fonction des concentrations de CMBA utilisées.



*Figure 35 : Influence du CMBA sur la croissance racinaire d'*Allium cepa*. Le CMBA est utilisé selon une gamme de concentration allant de 10^{-8} M à 5.10^{-5} M pendant 48h sur culture hydroponique d'*Allium cepa*. Les valeurs correspondent à la moyenne (\pm SE) de 9 racines pour chaque bulbe ($n=3$). Les groupes d'homogénéité sont définis par une probabilité $p<0.05$ selon le test de comparaison de Tukey HSD.*

On peut observer une diminution de croissance racinaire proportionnelle à la concentration de CMBA utilisée. La concentration minimale de CMBA ayant un impact

significatif est de 10^{-7} M. Cette concentration est aussi celle induisant l'apparition d'anomalies chromosomiques (chapitre 2). Ce résultat concorde aussi avec ceux observés lors des calculs de l'indice mitotique (chapitre 2). Il faut noter que les chromatographies HPLC réalisées avant et après l'expérimentation n'ont pas montré la présence de produits de transformation de la molécule CMBA.

2.2. Effets de XDD en cours d'hydrolyse sur la croissance racinaire d'*Allium Cepa*

Nous avons observé que XDD s'hydrolyse lentement en milieu aqueux à pH 7 et que cette transformation est accélérée en présence d'exsudat racinaire d'*Allium cepa*. Cette transformation de XDD produit deux molécules : HMBA et CHD. Cet aspect dynamique de la transformation du XDD rend la description des protocoles expérimentaux difficile. En effet, la concentration de chacun de ces composés va évoluer au cours des expérimentations biologiques pendant lesquelles les molécules XDD sont constamment au contact de l'exsudat racinaire. Ainsi, pour faciliter la description de chacune des solutions, un tableau récapitulant la composition de chacune des solutions utilisées durant nos études est fourni (tableau 1). Ce tableau décrit la composition de chaque solution (A – E) en XDD et en HMBA avant et après les traitements biologiques. Pour chaque solution les proportions de XDD et de HMBA sont données.

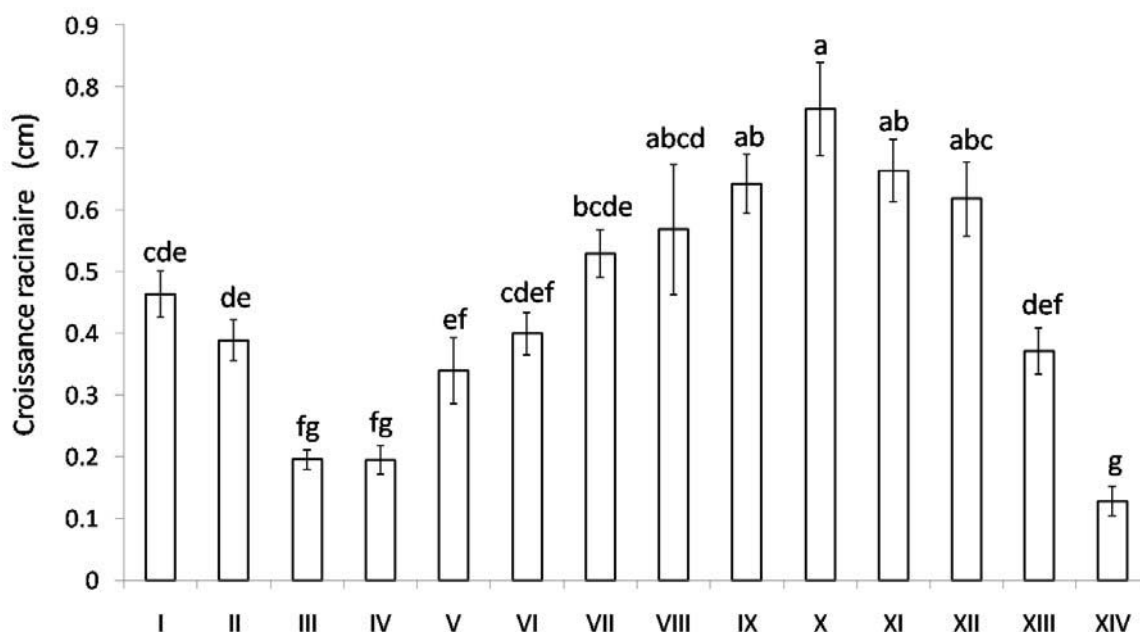
Une molécule de XDD se transformant en une molécule de HMBA et en une unité de CHD, la proportion en CHD est équivalente à celle du HMBA.

		Proportion molaire de chaque molécule contenue dans le mélange.		
Solutions	Molécules contenues dans les mélanges	Avant traitement	Après 48h de traitement	Figures correspondantes
A	XDD	0.85	0.59	figure III.13
	HMBA*	0.15	0.41	
B	XDD	0.85	[0.85 - 0.79]	figure III.14
	HMBA	0.15	[0.15 - 0.21]	
C	XDD	0.85	0.59	figure III.14
	HMBA	0.15	0.41	
D	XDD	0.00	0.00	figure III.14
	HMBA	1.00	1.00	
E	XDD	0.00	0.00	figure III.15/17/18/ 19/20/21/23/24
	HMBA	1.00	1.00	

Tableau 1 : Proportions molaires en XDD et en HMBA contenues dans les différentes solutions utilisées durant les expérimentations biologiques. (*) Les proportions en HMBA sont équivalentes à celles en CHD contenu dans la solution correspondante.

La solution A est étudiée sur le modèle *Allium cepa*. Nous avons mesuré les croissances racinaires après traitement par cette solution de XDD en cours de transformation. Des dilutions successives de la solution A sont effectuées pour déterminer

les concentrations ayant un impact sur la croissance racinaire. La concentration en XDD et en HMBA est indiquée dans le tableau de la figure 36. Le traitement hydroponique de 48h permet de calculer une différence de longueur racinaire grâce à des photographies effectuées avant et après traitement.



Concentrations de chaque molécule avant traitement biologique (M)														
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
XDD	0.0	8.5×10^{-10}	4.3×10^{-9}	8.5×10^{-9}	4.3×10^{-8}	8.5×10^{-8}	4.3×10^{-7}	8.5×10^{-7}	4.3×10^{-6}	8.5×10^{-6}	1.7×10^{-5}	2.6×10^{-5}	3.4×10^{-5}	4.3×10^{-5}
HMBA	0.0	1.5×10^{-10}	7.5×10^{-10}	1.5×10^{-9}	7.5×10^{-9}	1.5×10^{-8}	7.5×10^{-8}	1.5×10^{-7}	7.5×10^{-7}	1.5×10^{-6}	3.0×10^{-6}	4.5×10^{-6}	6.0×10^{-6}	7.5×10^{-6}

Figure 36 : Influence du XDD en cours de dégradation sur la croissance racinaire d'*Allium cepa*. Le mélange XDD et HMBA de la modalité A (tableau 1) est testé sur *Allium cepa* pendant 48h de traitement pour déterminer son impact sur la croissance racinaire. Les concentrations de chacun des composés du mélange avant traitement sont calculées par HPLC sur la solution mère avant dilutions. Les concentrations sont indiquées dans le tableau ci-dessus. Les valeurs correspondent à la moyenne (\pm SE) des croissances racinaires de 9 racines pour chaque bulbe ($n=3$). Les groupes d'homogénéité sont définis par une probabilité $p < 0.05$ selon le test de comparaison de Tukey HSD

La figure 36 présente la croissance racinaire d'*Allium cepa* en fonction des différentes concentrations de XDD et HMBA contenues dans la solution A avant les traitements biologiques. Nous observons une diminution significative de la croissance racinaire lors des traitements avec les plus faibles concentrations (III et IV). La croissance racinaire est ensuite

semblable à celle du témoin pour les concentrations intermédiaires (V jusqu'à VIII). On observe alors une croissance racinaire stimulée pour les concentrations IX à XI, avec une nette augmentation pour X. Pour les concentrations supérieures, une baisse progressive de croissance racinaire est observée chez *Allium cepa*.

Nous observons un effet inhibiteur significatif à la concentration III, qui correspond à une concentration en XDD de 4.3×10^{-9} M avant le traitement biologique. Cette concentration en XDD correspond à la concentration seuil pour laquelle une baisse de l'indice mitotique est observée dans le chapitre 2. De plus, dans le chapitre 2 nous avons observé une augmentation des fréquences d'anomalies à partir de 10^{-9} M. Nous pouvons donc suggérer que l'effet inhibiteur de la croissance racinaire observé aux faibles concentrations du traitement A est causé par la molécule XDD elle-même.

L'augmentation progressive jusqu'au maximum de croissance observée pour la concentration X, 8.5×10^{-6} M de XDD et 1.5×10^{-6} M de HMBA, avant le traitement biologique. La molécule XDD a un effet d'inhibition du développement racinaire. Il est donc probable que la molécule HMBA, très présente, soit à l'origine de cette stimulation de croissance racinaire.

La figure 36 serait donc le résultat d'une superposition d'effets provoqués par les molécules XDD et HMBA. Il faut ajouter que le mélange est dynamique et que les concentrations en XDD et HMBA évoluent pendant le traitement biologique. Les concentrations en XDD diminuent alors que les concentrations en HMBA augmentent. Les proportions molaires de chacune de ces molécules après traitement sont données dans le tableau 1. Le traitement par des concentrations plus fortes (XIV) met en évidence un aspect gélatineux des méristèmes, qui serait relié à la mort de cellules racinaires.

Nous avons ensuite voulu vérifier si l'augmentation de la croissance racinaire n'est pas provoquée par la molécule XDD mais par un de ses produits de transformation. Trois modalités de traitement sont étudiées : la première consiste à renouveler toutes les 8h la solution de XDD pour éviter l'accumulation des produits de dégradation (solution B); la seconde est réalisée sur une solution de XDD subissant 48h de traitement biologique (solution C) ; la troisième modalité est effectuée avec une solution de XDD préalablement

dégradée en présence de racines d'*Allium cepa* (solution D). Les proportions en XDD et en HMBA avant et après traitement sont données dans le tableau 1 et sont rappelées en concentration molaire dans la figure 37.

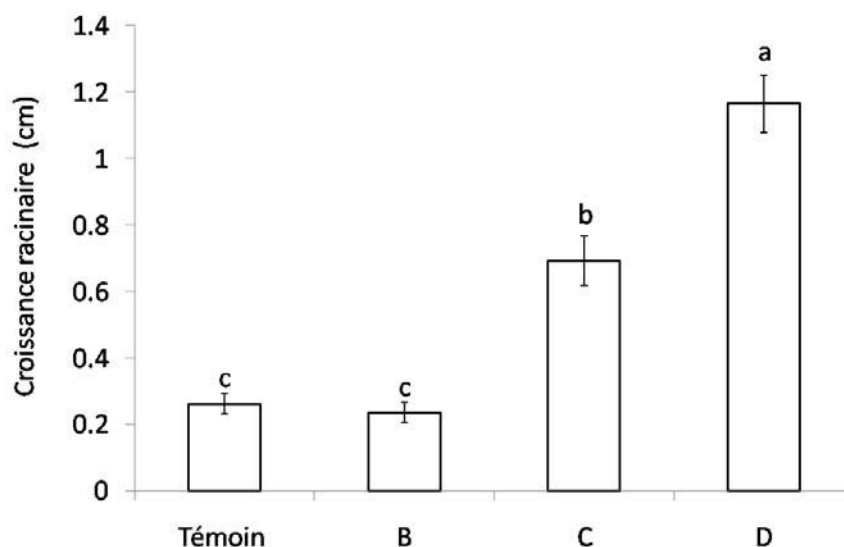
La figure 37 illustre la croissance racinaire d'*Allium cepa* en fonction du niveau de dégradation de XDD. Ces croissances racinaires peuvent être comparées à une condition témoin (solution A) dans laquelle les racines sont mises en présence d'eau distillée.

Le traitement avec la solution B qui est renouvelée toutes les 8 h ne présente pas de différence significative par comparaison au traitement témoin pour la croissance racinaire. Cette modalité de traitement permet d'empêcher l'accumulation des produits de dégradation de XDD dans le milieu en présence des racines d'*Allium cepa*. Cette modalité est à comparer avec le traitement par la solution C, pour lequel les molécules ont subi une transformation tout au long des 48h de l'expérimentation.

Le traitement par la solution C provoque une augmentation de la croissance racinaire significativement différente de la condition témoin (A) et de la modalité B. La croissance est donc provoquée par l'accumulation des produits de dégradation de XDD pendant le traitement.

La dernière modalité est effectuée avec une solution de XDD préalablement transformée pendant 120h en présence de racines d'*Allium cepa*. Cette solution D ne contient plus que les produits de transformation HMBA et CHD. Cette nouvelle modalité d'expérimentation permet d'observer une nette augmentation de la croissance racinaire.

Cette étude permet de conclure que la dégradation du XDD augmente la croissance racinaire. L'un des produits de dégradation, ou le mélange de ces produits de dégradation, semble être à l'origine d'une forte stimulation de la croissance racinaire d'*Allium cepa* en condition hydroponique.



		Concentration de chaque molécule contenue dans le mélange (M)	
Solutions	Molécules contenues dans les mélanges	Avant traitement	Après 48h de traitement
Témoin	XDD HMBA	0 0	0 0
B	XDD HMBA	8.5×10^{-06} 1.5×10^{-06}	$[8.5 \times 10^{-06} - 7.9 \times 10^{-06}]$ $[1.5 \times 10^{-06} - 2.1 \times 10^{-06}]$
C	XDD HMBA	8.5×10^{-06} 1.5×10^{-06}	5.9×10^{-06} 4.1×10^{-06}
D	XDD HMBA	0.00 1.0×10^{-05}	0.00 1.0×10^{-05}

Figure 37 : Influence du XDD à différents stades de dégradation sur la croissance racinaire d'Allium cepa. XDD est testé à différents niveaux de transformation sur Allium cepa pendant 48h. La solution B est une modalité de traitement pour laquelle la solution est renouvelée toutes les 8h pendant les 48h de traitement, les concentrations en XDD et en HMBA se trouvent dans la fourchette de concentrations indiquées dans le tableau. La solution D est une solution de XDD préalablement dégradé en présence de racine d'Allium cepa pendant 120h, il ne reste plus de XDD dans cette solution et seuls le HMBA et le CHD vont altérer la croissance racinaire. Le traitement est réalisé sur 48h. Les valeurs correspondent à la moyenne (\pm SE) des croissances racinaires de 9 racines pour chaque bulbe (n=3). Les groupes d'homogénéité sont définis par une probabilité $p < 0.05$ selon le test de comparaison de Tukey HSD.

2.3. Effets de XDD totalement hydrolysé sur la croissance racinaire.

Nous avons observé précédemment que plus XDD était dégradé, plus la solution avait un effet stimulateur de la croissance racinaire d'*Allium cepa*. Nous avons donc réalisé une série d'expérimentations sur une solution de XDD complètement transformée (solution E du tableau 1). Cette solution est analysée préalablement en chromatographie liquide pour vérifier l'absence de molécules XDD. Nous avons ensuite choisi de tester l'activité de stimulation de croissance de cette solution composée de CHD et de HMBA à différentes dilutions sur *Allium cepa* et sur d'autres espèces modèles.

2.3.1. Test de croissance sur *Allium cepa*.

La figure 38 montre la croissance racinaire d'*Allium cepa* traité par la solution E à différentes dilutions. Cette solution E est constituée de HMBA et de CHD aux mêmes concentrations molaires. La gamme de concentration utilisée s'étend de 10^{-7} M à $5 \cdot 10^{-5}$ M en HMBA et en CHD. Le traitement a été réalisé sur 48h et la croissance racinaire est donnée par la différence de longueurs des racines avant/après traitement. Une augmentation significative de la croissance racinaire est observée à partir de la concentration $5 \cdot 10^{-6}$ M en HMBA et CHD. Elle est observée jusqu'à la concentration la plus forte ($5 \cdot 10^{-5}$ M) pour laquelle une croissance de 1.6 cm est mesurée. Un exemple est donné pour observer les détails macroscopiques (figure 39).

Ces résultats confirment l'action stimulatrice de la croissance racinaire chez *Allium cepa* des produits d'hydrolyse de XDD. De plus un dénombrement de cellules en mitose a été réalisé sur le traitement à 10^{-5} M de HMBA et CHD. Nous avons pu observer une augmentation significative de l'indice mitotique qui passe de 10% pour le témoin (eau distillée) à près de 15% pour le traitement 10^{-5} M en HMBA et CHD. La stimulation de la croissance racinaire semble donc faire intervenir une augmentation significative de l'indice mitotique.

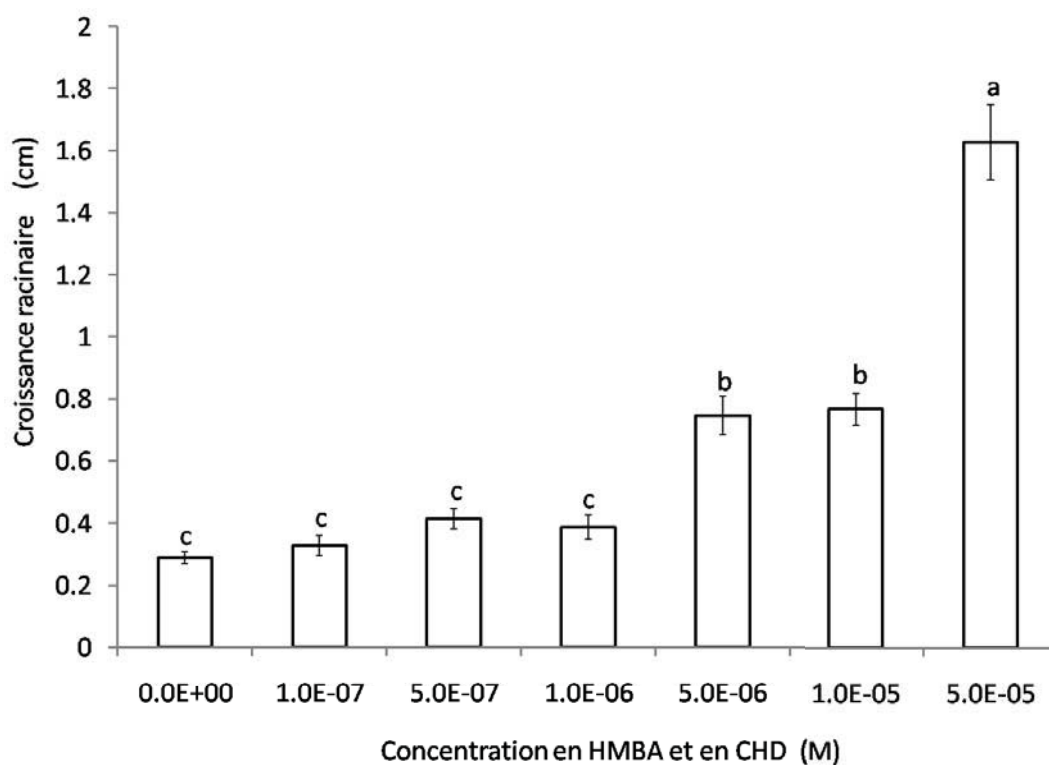
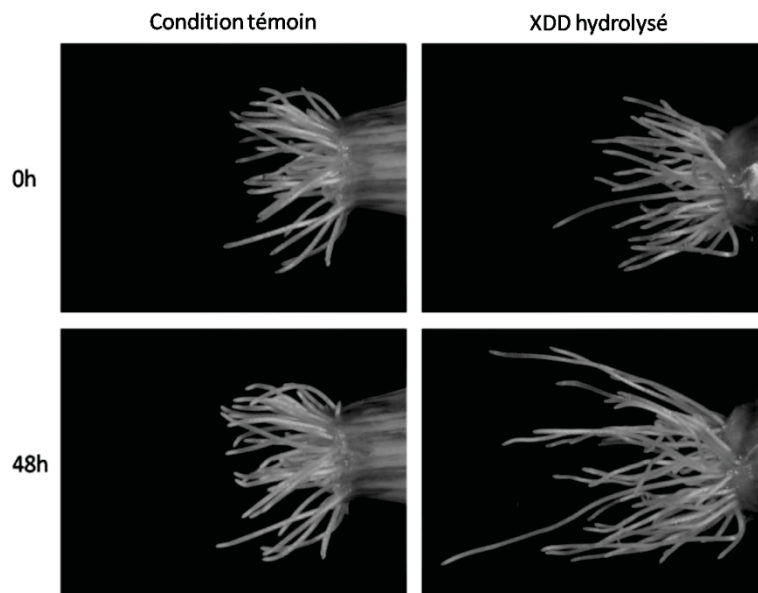


Figure 38 : Influence d'une solution de XDD totalement hydrolysé sur la croissance racinaire d'Allium cepa. La solution E est testée sur Allium cepa pour une gamme de concentration allant de 10^{-7} M à 5.10^{-5} M de HMBA et CHD pendant 48h. Les valeurs correspondent à la moyenne (\pm SE) de croissance racinaire de 9 racines pour chaque bulbe ($n=3$). Les groupes d'homogénéité sont définis par une probabilité $p<0.05$ selon le test de comparaison de Tukey HSD.



*Figure 39 : Influence d'une solution de XDD totalement hydrolysé sur la croissance racinaire d'*Allium cepa*. La solution E est testée à 5.10^{-6} M de HMBA et CHD pendant 48 heures de traitement. Un traitement témoin est représenté à titre de comparaison.*

2.3.2. Test de croissance sur d'autres familles à bulbe

L'étude de l'action des produits CHD et HMBA en mélange a été élargie sur d'autres espèces végétales à bulbe comme *Habranthus robustus*, *Iris hollandica* et *Gladiolus grandiflorus*. Les expérimentations ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour *Allium cepa* en mesurant la croissance racinaire après traitement par la solution E pendant 48h.

La figure 40 décrit la croissance racinaire de trois espèces végétales à bulbe dans l'eau distillée (témoin) ou dans la solution E contenant 5.10^{-6} M de HMBA et CHD. Cette concentration a été choisie car elle est efficace sur *Allium cepa*. Les tests statistiques comparent les plantes traitées aux témoins, une différence significative ($p < 0.05$) est représentée par un astérisque (*).

Une croissance significativement différente est observée après traitement, chez les Iris et les Glaïeuls, pour la concentration 5.10^{-6} M de HMBA et CHD. Aucune différence de croissance n'est observée chez *Habranthus* entre les témoins et les traitées. Ces résultats indiquent une sensibilité variable des espèces végétales aux molécules utilisées. Un traitement par 5.10^{-6} M de HMBA et CHD chez *Habranthus* n'est pas suffisant pour stimuler la croissance racinaire.

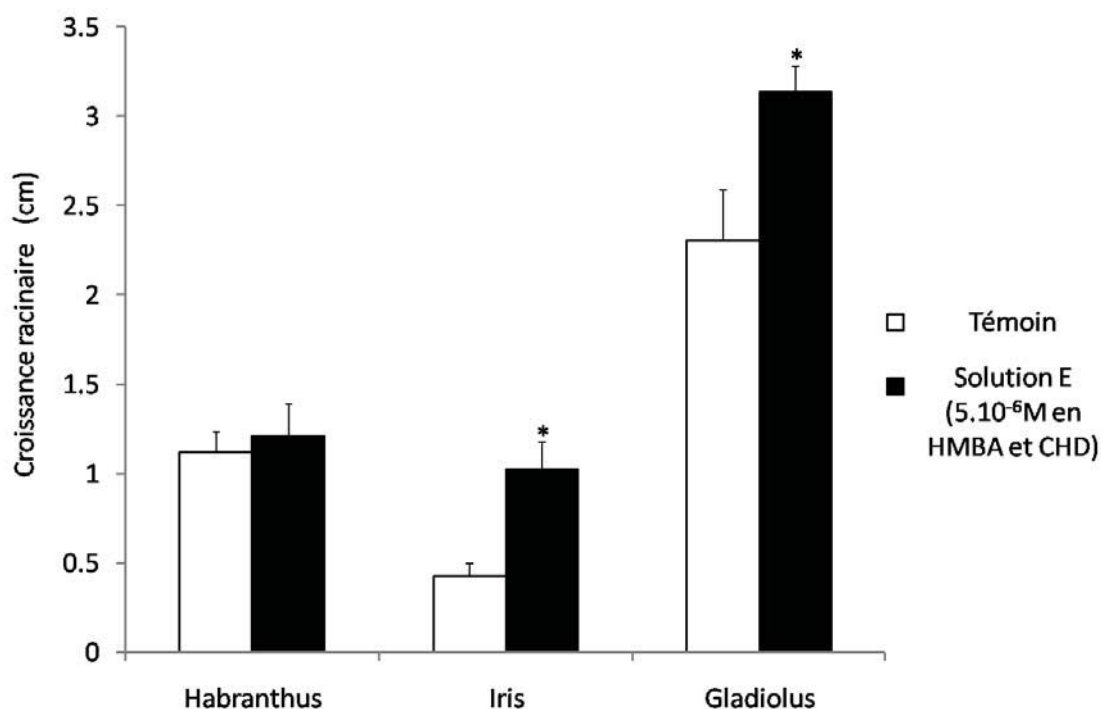


Figure 40 : Influence d'une solution de XDD totalement hydrolysé sur la croissance racinaire de Habranthus robustus, Iris hollandica et Gladiolus grandiflorus. La solution E est testée avec une concentration de 5.10^{-6} M en HMBA et CHD pendant 48h. Les valeurs correspondent à la moyenne (\pm SE) de la croissance racinaire de 5 à 10 racines pour chaque bulbe ($n=3$). La comparaison des moyennes entre témoins et traités est réalisée par un test t de Student ($p<0.05$).

2.3.3. Test de croissance sur Zea mays

L'action des produits CHD et HMBA en mélange a été mesurée chez *Zea mays*. Les plants de maïs ont été préalablement mis à germer dans la vermiculite puis repiqués en système hydroponique au stade de développement 3 feuilles. Ce test a été réalisé avec dilution de la solution E pour des concentrations en HMBA et en CHD de 5.10^{-7} et 5.10^{-6} M. Ces traitements peuvent être comparés à la condition témoin contenant uniquement le milieu nutritif.

La figure 41 illustre la croissance racinaire moyenne de *Zea mays*. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de la croissance racinaire de *Zea mays* après le traitement par la solution E pour des concentrations de HMBA et CHD de 5.10^{-7} M. La concentration la plus forte (5.10^{-6} M) ne provoque pas de croissance racinaire mais induit une texture gélatineuse des racines, vraisemblablement témoin de mort cellulaire. Une concentration trop élevée en HMBA et CHD entraîne un effet de surdose et a un effet inhibiteur de la croissance et de la viabilité du tissu racinaire.

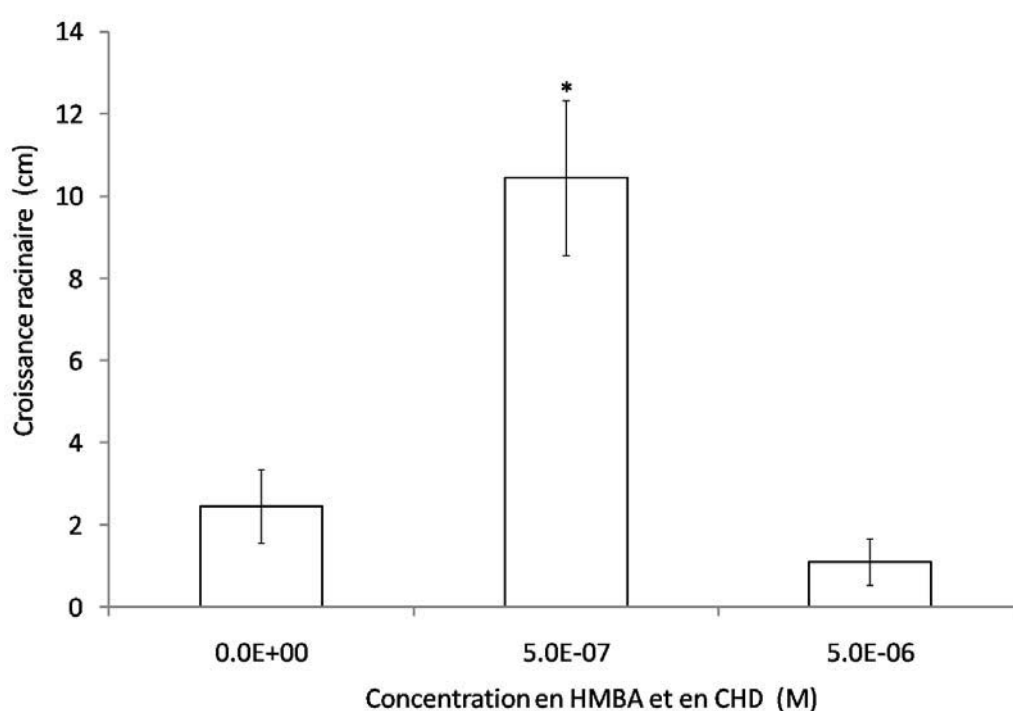


Figure 41 : Influence d'une solution de XDD hydrolysé sur la croissance racinaire de Zea mays. La solution E est testée pour des concentrations 5.10^{-7} et 5.10^{-6} M en HMBA et en CHD pendant 14 jours sur la croissance racinaire. Les valeurs correspondent à la moyenne (\pm SE) de la croissance de la racine principale de 3 plants de maïs. La comparaison des moyennes entre témoins et traités est réalisée par un test t de Student ($p < 0.05$).

L'effet stimulateur de croissance de la solution de XDD totalement hydrolysé est observé chez cette plante monocotylédone. Le mélange des produits d'hydrolyse de XDD présente un optimum d'action dont le maximum dépend du modèle végétal étudié.

2.3.4. Test de croissance sur *Arabidopsis thaliana*.

La culture *Arabidopsis thaliana* est réalisée sur milieu nutritif gélosé supplémenté ou non en solution E, contenant HMBA et CHD de 10^{-7} à 5.10^{-6} M. Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence significative de croissance de la racine principale dans nos conditions expérimentales. En revanche, nous avons pu observer une diminution importante du nombre de racines latérales chez les plantules traitées par la concentration la plus forte (5.10^{-6} M de HMBA et CHD) à partir de 12 jours de traitement (figure 42). De plus, chez ces mêmes plantules, une décoloration des cotylédons et des premières feuilles est observée au bout de 12 jours de traitement accompagnée par un retard de croissance des parties végétales aériennes.

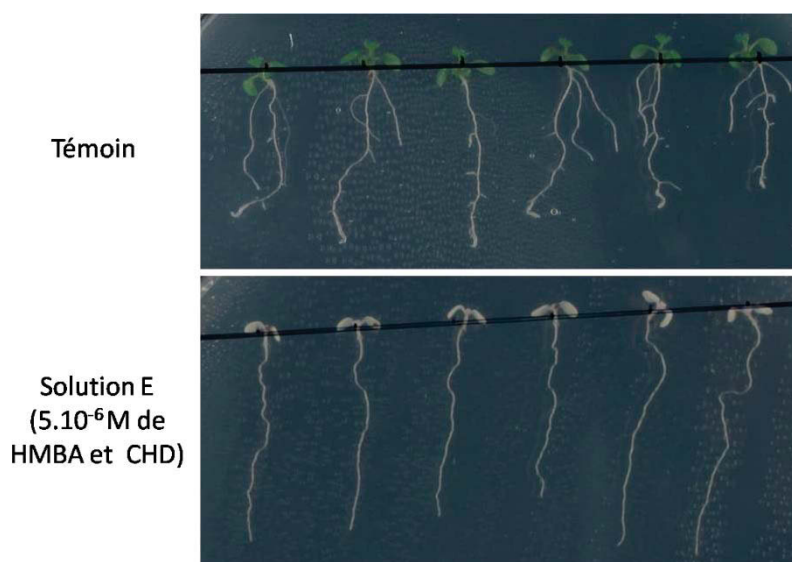


Figure 42 : Influence d'une solution de XDD totalement hydrolysé sur la croissance racinaire d'*Arabidopsis thaliana*. La solution E est testée pour 5.10^{-6} M de HMBA et CHD pendant 12 jours de traitement. Un témoin de croissance est représenté à titre de comparaison.

La décoloration des cotylédons et des premières feuilles ainsi que le retard de croissance des parties aériennes s'accroissent au cours du temps. La figure 43 montre une photographie prise après 20 jours de traitement.

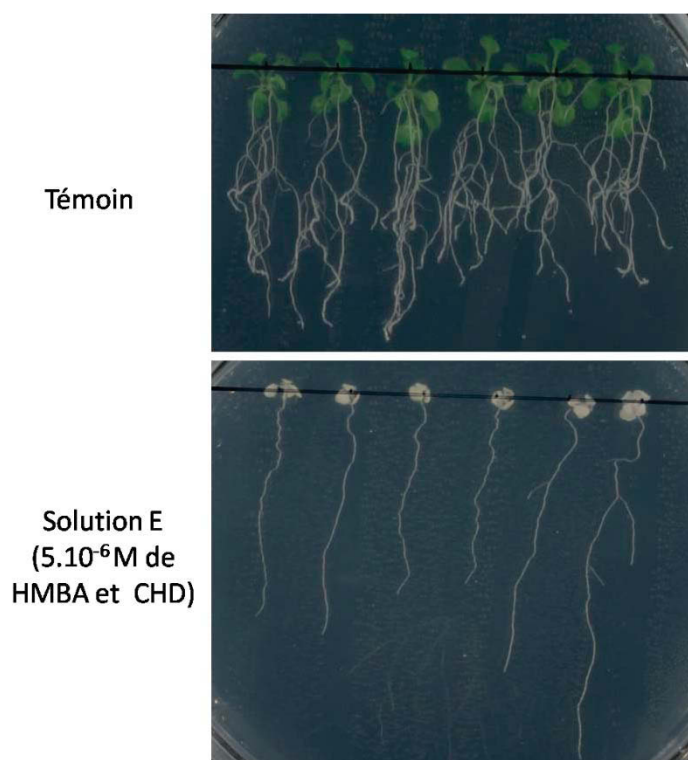


Figure 43 : Influence d'une solution de XDD totalement hydrolysé sur la croissance racinaire d'Arabidopsis thaliana. La solution E est testée pour 5.10^{-6} M de HMBA et CHD pendant 20 jours de traitement. Un témoin de croissance est représenté à titre de comparaison.

Au bout de 45 jours de traitement avec 5.10^{-6} M de HMBA et CHD l'apparition d'un amas cellulaire désorganisé est observée au niveau des cotylédons. Ces « cals » cellulaires semblent être issus d'une dédifférenciation cellulaire induite par les fortes concentrations de HMBA et CHD (figure 44).

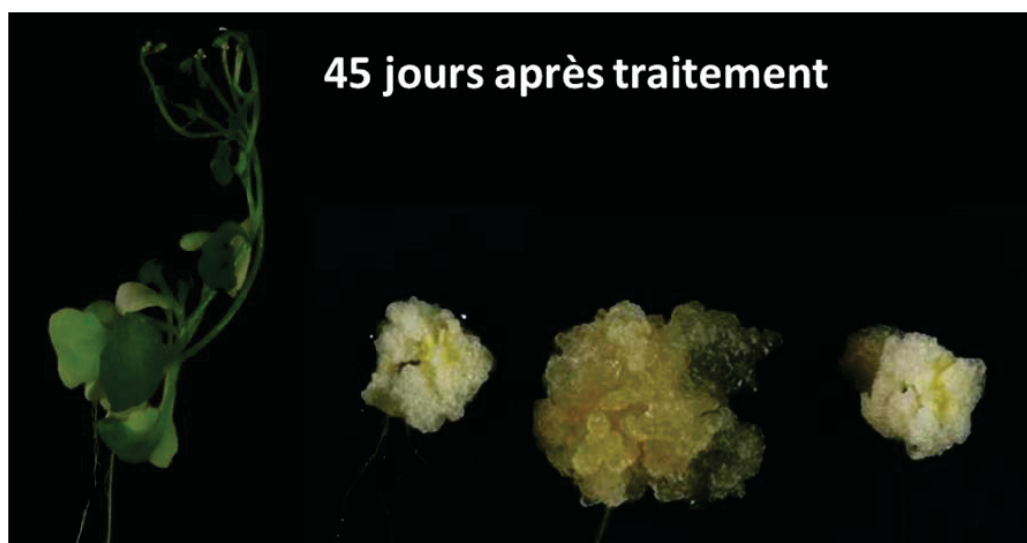


Figure 44 : Influence d'une solution de XDD hydrolysé sur la croissance racinaire d'Arabidopsis thaliana. La solution E est testée pour 5.10^{-6} M de HMBA et CHD pendant 45 jours de traitement. Un témoin de croissance est représenté à titre de comparaison.

La solution E testée sur *Arabidopsis thaliana* ne semble pas stimuler la croissance racinaire pour les concentrations en HMBA et CHD utilisées. La concentration la plus forte semble perturber les systèmes de développement racinaire en stoppant la production de racines latérales. Le système de développement aérien semble lui aussi perturbé, et une perte importante de pigmentation chlorophyllienne est observée sur les cotylédons ainsi qu'une inhibition de la croissance de la partie aérienne. Un traitement long entraîne l'apparition d'une structure aérienne désorganisée à l'aspect de cals cellulaires.

2.3.5. Test sur *Lycopersicon esculentum* L. et *Populus trimula* × *alba*

L'effet des produits d'hydrolyse de XDD a été mesuré sur d'autres plantes dicotylédones, tomate et peuplier en culture hydroponique. Les concentrations en HMBA et CHD utilisées étaient de 10^{-6} et 5.10^{-6} M. Ces traitements ont montré une diminution de la croissance racinaire chez ces deux types de plante. Ce ralentissement de croissance racinaire par rapport aux témoins est accompagné d'une décoloration des jeunes feuilles chez la tomate et une faible croissance foliaire chez le peuplier. Ces effets délétères sont observés au bout de 8 à 12 jours mais doivent être confirmés.

2.4. HMBA : molécule candidate comme stimulateur de croissance racinaire.

Les milieux enrichis en HMBA semblent provoquer une importante stimulation de croissance racinaire de certaines espèces. De plus, la structure chimique du HMBA est une forme substituée méthyl sulfonée d'une hormone végétale bien connue : l'acide salicylique (figure 45).

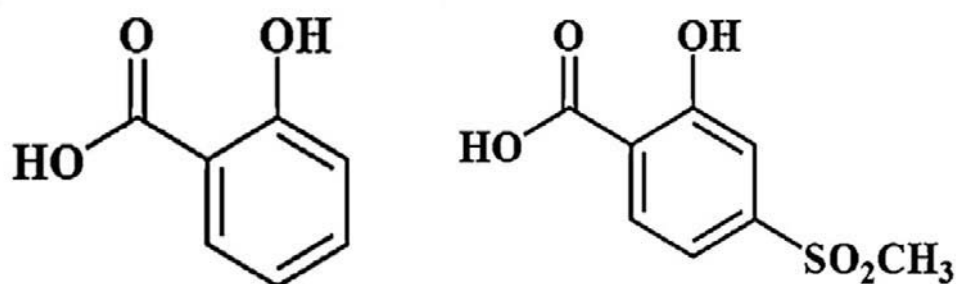


Figure 45 : structure chimique de l'acide salicylique et du HMBA

L'acide salicylique (SA) est largement connu pour son rôle médiateur dans la réponse des plantes contre les agents pathogènes (Durner *et al.*, 1997). Cette phytohormone est aussi connue pour augmenter la croissance racinaire et aérienne (Hussein *et al.*, 2007), augmenter l'indice mitotique (Shakirova *et al.*, 2003) et affecter l'élongation cellulaire (Vanacker *et al.*, 2001)

Une augmentation de la croissance racinaire, ainsi que de l'indice mitotique sont observées chez *Allium cepa* pour une concentration de 10^{-5} M en HMBA et CHD (figure 46). Nous avons donc émis l'hypothèse que la molécule responsable de la stimulation de croissance dans le mélange (HMBA et CHD) est le HMBA. Pour confirmer cette hypothèse nous avons étudié l'effet du HMBA seul.

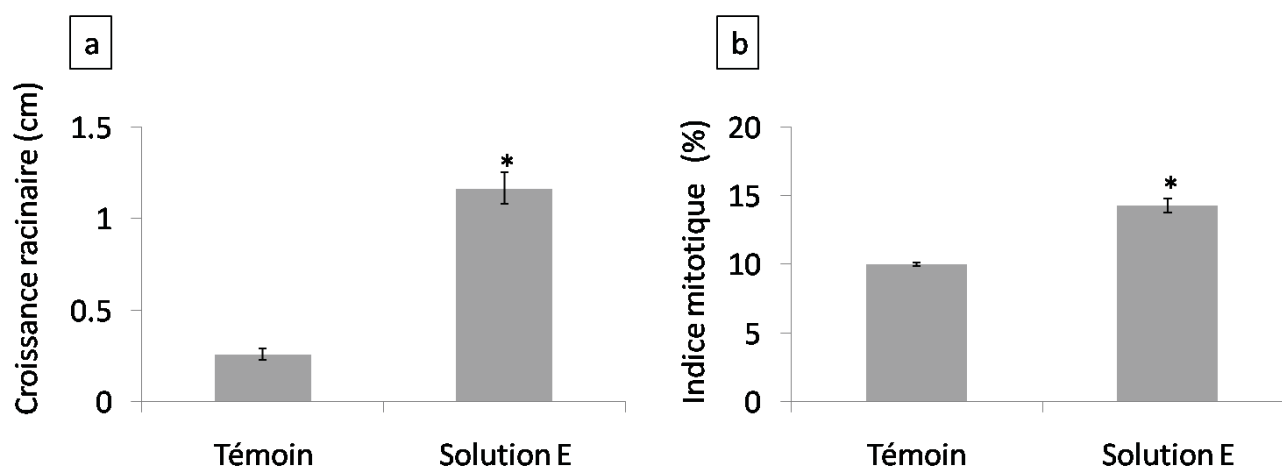


Figure 46 : Influence d'une solution de XDD totalement hydrolysé sur le système racinaire d'Allium cepa. La solution E est testée pour une concentration de 10⁻⁵ M en HMBA et CHD pendant 48h sur la croissance racinaire (a) et sur l'indice mitotique du méristème racinaire (b). Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm SE). La comparaison des moyennes entre échantillons témoins et traités est réalisée par un test t de Student ($p < 0.05$).

La molécule HMBA pure a été testée. De jeunes plants de *Zea mays* ont été traités avec une solution de HMBA (Interchim®) à des concentrations allant de 10⁻⁷ à 5.10⁻⁶ M. Ces traitements ont été comparés aux traitements par la solution E contenant HMBA et CHD et à un traitement témoin ne contenant que le milieu nutritif.

La figure 47 montre la croissance racinaire moyenne des plantules de *Zea mays* après 14 jours de traitement hydroponique par la solution E ou par HMBA pur. Les concentrations indiquées correspondent à la concentration en HMBA contenue dans la solution E ou dans la solution de HMBA pur.

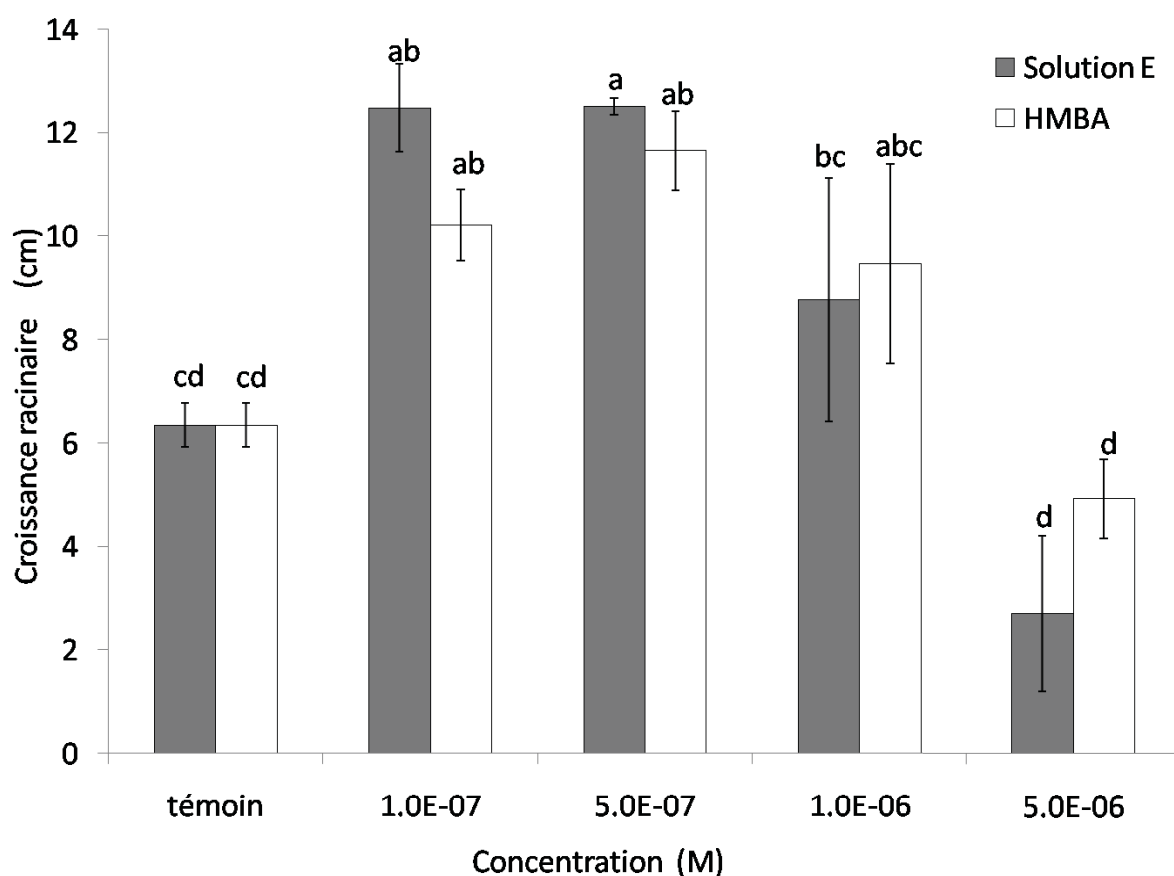


Figure 47 : Influence d'une solution de XDD totalement hydrolysé (gris) et d'une solution de HMBA pur (blanc) sur la croissance racinaire de Zea mays. La gamme de concentrations en HMBA contenue soit dans la solution E soit dans la solution de HMBA pur s'étend de 10^{-7} M à $5 \cdot 10^{-6}$ M. le traitement a duré 14 jours. Les valeurs correspondent à la moyenne (\pm SE) de la croissance racinaire de la racine principale de 3 plants de maïs. Les groupes d'homogénéité sont définis par une probabilité $p < 0.05$ selon le test de comparaison de Tukey HSD.

Nous pouvons observer une forte similitude entre les profils d'action de XDD totalement hydrolysé et HMBA pur. Cela suggère l'implication du HMBA dans les effets stimulateurs de croissance du mélange (HMBA et CHD).

Nous envisageons néanmoins d'étudier l'effet du CHD seul que ce soit d'un point de vue toxicité (avec l'analyse de l'indice mitotique et des fréquences d'anomalies) ou sur la croissance racinaire.

3. Discussion

Les résultats obtenus dans le chapitre 3 décrivent la toxicité du CMBA et du XDD sur la croissance racinaire. Ces résultats concordent avec les observations effectuées dans le chapitre 2 pour lesquels une baisse de l'indice mitotique ainsi qu'une augmentation de la fréquence des anomalies chromosomiques avaient pu être observée. Les faibles croissances racinaires obtenues après les traitements par CMBA et XDD peuvent être corrélées aux faibles indices mitotiques calculés dans le chapitre 2. On peut donc conclure que la technique utilisée permet elle aussi d'évaluer la toxicité de molécules xénobiotiques et que les molécules CMBA et XDD ont toutes deux une activité toxique forte chez le végétal et cela même à de très faibles concentrations.

Le CHD est l'une des molécules obtenues après l'hydrolyse de XDD. Cette molécule n'a pas été étudiée durant nos travaux. Dans la littérature, aucun auteur n'a rapporté l'effet du CHD sur les mécanismes de croissance végétale. De plus, la molécule CHD n'est pas une candidate potentiellement toxique d'après des tests biologiques déjà effectués (PubChem). Il est important de noter que le CHD est aussi obtenu lors de l'hydrolyse de la sulcotrione en CMBA (Chaabane *et al.*, 2005; ter Halle *et al.*, 2009).

La croissance racinaire stimulée lors des traitements avec XDD totalement hydrolysé nous a donc permis d'identifier une molécule proche de la structure de l'acide salicylique. Le HMBA induit une croissance racinaire différente selon les espèces végétales avec des effets stimulateurs de croissance chez certaines espèces monocotylédones. Ces résultats ont été validés par traitement avec la molécule HMBA pure.

D'après la littérature l'acide salicylique est considéré comme un messager cellulaire et une hormone végétale intervenant au cours d'un stress biotique ou abiotique (Vlot *et al.*, 2009). Cette molécule est impliquée dans des régulations de croissance (Manthe *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 2014). La croissance racinaire a été précédemment montrée comme étant stimulée par SA chez de nombreuses espèces végétales (Hayat *et al.*, 2010). Chez le blé, la croissance racinaire est caractérisée par un indice mitotique augmenté (Hayat *et al.*, 2013; Shakirova *et al.*, 2003). HMBA, dont la structure est très proche de SA semble reproduire ces effets physiologique sur les racines.

Pour conclure, la formation du composé HMBA à partir de sulcotrione fait intervenir deux transformations chimiques. La première transformation est une photodégradation de la sulcotrione en XDD. Cette transformation réalisée en conditions contrôlées est tout à fait envisageable dans les conditions naturelles lors des traitements en champs en été par beau temps. Les molécules XDD ainsi formées peuvent ensuite être hydrolysées en HMBA au contact de l'eau, dans le sol, puis être au contact de la plante (figure 48).

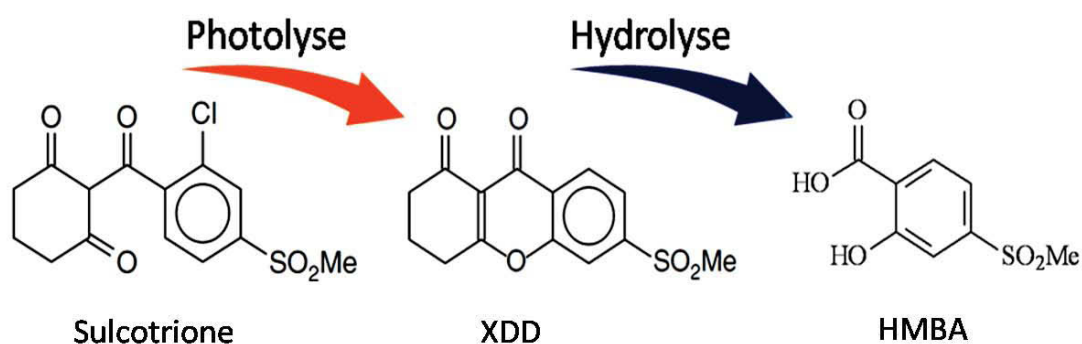


Figure 48 : Schéma représentant la voie de transformation de la sulcotrione en XDD puis en HMBA.

Discussion générale

L'étude de la toxicité des produits phytopharmaceutiques s'est beaucoup développée durant les dernières années. En effet, évaluer l'impact des molécules chimiques sur notre environnement est devenu une problématique culturelle des pays industriellement avancés et de nombreuses lois et réglementations ont vu le jour dans ce contexte. En Europe et en France plusieurs molécules phytopharmaceutiques ont été interdites à la vente suite à des rapports inquiétants quant à leurs implications dans diverses maladies chez l'humain mais aussi sur leurs impacts chez les organismes aquatiques (Aubertot et Carpentier, 2011). Les nouvelles réglementations, fondées sur des études en laboratoire, imposent une meilleure connaissance de ces molécules et de leurs effets sur l'homme et son environnement. Il en va notamment de l'étude des produits de transformation des xénobiotiques dans l'environnement. En effet une molécule chimique est influencée par son milieu et peut se transformer en de nouvelles molécules qui ne sont pas ou peu connues. Ces nouvelles molécules peuvent perdre les propriétés de la molécule d'origine et en acquérir de nouvelles. Ces molécules peuvent par exemple présenter des propriétés toxiques pour le vivant et engendrer des anomalies génétiques entraînant des mutations. Ces modifications sont susceptibles en théorie d'affecter plusieurs niveaux d'organisation biologique, de la molécule à la population en modifiant des fonctions telles que le développement, la reproduction et la survie des individus et ainsi compromettre la dynamique de croissance des populations (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Les dossiers d'homologation comportent des informations sur les principaux produits de transformation par voies biotiques et abiotiques, mais les données fournies sont le plus souvent très incomplètes. Par exemple, les tests de phototransformation sont effectués uniquement dans l'eau et sur le sol. La photolyse sur les feuilles et les changements de pH ne sont pas pris en compte, ce qui est un grand manque si l'on se réfère aux résultats de ce travail.

La problématique soulevée par notre étude est de suivre le devenir d'une molécule à caractère cytotoxique soumise à une photo-transformation et d'évaluer les propriétés de toxicité et leurs évolutions au cours des différentes étapes de la transformation. La photo-transformation des produits phytopharmaceutiques sur les plantes après leur pulvérisation est en effet une voie de transformation non négligeable pour une grande partie d'entre eux lorsque les conditions climatiques sont à la fois ensoleillées et sèches. Pour répondre à cette problématique, une molécule mère ainsi que ses différents produits de transformation de

première ou seconde génération ont été caractérisés. Notre étude est fondée sur la transformation d'une molécule d'intérêt agronomique, la sulcotrione, lorsque celle-ci est soumise à une irradiation comparable à celle qu'elle subit en conditions naturelles. Cette transformation a été suivie en laboratoire puis les produits de transformation ont été étudiés sur le modèle végétal *Allium cepa* pour déterminer leurs impacts toxicologiques.

1. Réflexion sur la méthode

L'évaluation de la toxicité d'une molécule est réalisable grâce à de nombreuses techniques et en utilisant différents modèles. Chaque technique ayant ses points forts et points faibles nous avons décidé de nous focaliser sur un protocole permettant de quantifier le plus de paramètres possibles. L'évaluation du caractère génotoxique d'une molécule peut se réaliser au niveau du méristème racinaire en recherchant des anomalies survenues lors des phases de mitoses (Ji *et al.*, 1999; Marcano *et al.*, 2002; Steinkellner *et al.*, 1998). Le méristème étant à l'origine de toutes les cellules racinaires (Cederholm *et al.*, 2012), des anomalies structurales au niveau des chromosomes de ces cellules sont répercutées sur l'intégralité de la racine et peuvent présenter des effets néfastes à long terme pour les plantes.

L'étude des anomalies chromosomiques permet, par analyse microscopique, d'avoir à la fois des informations sur le nombre et le type des anomalies chromosomiques apparaissant durant la mitose mais aussi d'évaluer la qualité et la quantité des mitoses à un temps donné (Rank et Nielsen, 1997). Cette étape de caractérisation des différents types d'anomalies que peut subir une cellule en division permet *a posteriori* de suggérer différents mécanismes biologiques impliqués pendant un stress chimique, comme par exemple à la suite de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Kovalchuk *et al.*, 2001) ou la formation de ponts en ana-télophase pouvant résulter de cassures chromosomiques (Nicoloff et Gecheff, 1976; Rank et Nielsen, 1993). Il faut noter que bien que cette technique soit riche en informations, elle demande des comptages longs à réaliser.

De plus, si certaines techniques comme le test des comètes, permettent d'évaluer avec précision les dommages de l'ADN, cette technique ne permet de quantifier qu'un seul paramètre : les cassures simples ou double brin des molécules d'ADN (Collins *et al.*, 2008). Elle ne permet pas de savoir si le fuseau de microtubules est altéré ou si un blocage s'est

produit à une phase mitotique alors qu'une étude des anomalies chromosomiques durant les phases mitotiques le permet. En revanche, le test des comètes permet d'avoir une information sur la toxicité d'un produit sur des cellules non méristématiques puisque cette technique peut se réaliser sur tous les types de cellules somatiques (Cavas et Konen, 2007).

2. Réflexion sur le modèle d'étude

L'évaluation de la toxicité d'un produit xénobiotique ou d'autres produits chimiques est le plus souvent réalisée sur des modèles de microorganismes à l'aide de tests standardisés comme avec le test Microtox® [norme NF EN ISO 11348-3 (1999)]. Ces tests rapides donnent un premier aperçu de la toxicité d'un produit. Malheureusement ce genre de test ne permet pas d'observer les répercussions sur des organismes plus évolués et il faut étendre la caractérisation sur des modèles animaux pour conclure sur la dangerosité de ces molécules pour l'humain. Il existe en effet de nombreuses différences au niveau de la tolérance à un stress entre un microorganisme unicellulaire et un organisme pluricellulaire eucaryote. Les organismes complexes ont des systèmes de détoxification plus performants que les microorganismes unicellulaires (organes de détoxification chez les animaux comme les reins, le foie). Les systèmes de réparation de l'ADN sont notamment bien plus complexes et permettent une meilleure stabilité du génome au cours des générations, comme par exemple avec le système NHEJ (« Nonhomologous DNA End Joining ») (Brissett et Doherty, 2009; Lieber, 2010). Un produit aux caractères génotoxiques aurait donc un impact différent selon les modèles d'étude.

Il est à noter que peu d'études toxicologiques sont réalisées sur les végétaux. Ceux-ci sont des êtres vivants prépondérants dans notre environnement. Leurs réponses face aux stress chimiques permettent une bonne évaluation de l'impact écotoxicologique des xénobiotiques. Selon de nombreux auteurs, les tests de toxicité sur les végétaux devraient être davantage intégrés aux études écotoxicologiques en tant que première étape de détection d'une pollution ou en complémentarité avec les autres tests couramment utilisés (Grant et Salamone, 1994).

Les études toxicologiques sur modèle végétal ont l'avantage d'être réalisées en laboratoire à un faible coût et l'étude au microscope est facilitée par la présence de chromosomes de grande taille chez certaines plantes. Les modèles *Vicia faba*, *Allium cepa* et

Tradescantia sont les plus largement utilisés et permettent de réaliser des tests de génotoxicité de bonne qualité car ces organismes possèdent un nombre réduit de gros chromosomes (Grant, 1994). En effet, les réponses face aux agents mutagènes sont similaires à celles des animaux (Sparrow *et al.*, 1972). Notre choix s'est porté sur *Allium cepa* qui, contrairement à *Vicia faba*, ne nécessite que 48h de pré-culture pour obtenir des racines en quantité suffisante. Les traitements sur le modèle *Allium cepa* sont réalisés à l'obscurité, ce qui permet de limiter la formation de nouveaux composés due à la photosensibilité des matières actives étudiées. De plus, la culture hydroponique d'*Allium cepa* dans l'eau sans ajout d'éléments nutritifs permet d'éviter des interactions potentielles entre les xénobiotiques et les éléments nutritifs.

Les bulbes d'*Allium cepa* utilisés lors de nos études ont donc été choisis exempts de produits phytopharmaceutiques antérieurs. Le producteur utilisant une culture « traditionnelle » nous a assuré une production végétative de bulbes à partir d'un bulbe originel. Cette multiplication végétative permet de préserver un fond génétique relativement stable entre nos individus. Les bulbes n'ont pas subi de traitement anti-germinatif pouvant altérer les résultats expérimentaux.

3. Formations de XDD et de HMBA

La sulcotrione [2-[2-chloro-4-(méthylsulfonyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione], est un acide faible de la famille des tricétones et un herbicide utilisé lors de la culture du maïs proposé pour remplacer l'atrazine. Cet herbicide foliaire permet un désherbage performant. La sulcotrione est généralement utilisée en post-levée au stade de 4-6 feuilles du maïs, mais peut aussi être utilisée en pré-émergence et en pré-semis. Cependant, son impact environnemental est très peu documenté.

La sulcotrione est absorbée par les feuilles et les racines des plantes et agit principalement par voie foliaire en affectant la synthèse de la chlorophylle. Le mode d'action des tricétones au niveau des plantes est lié à l'inhibition de la 4-hydroxyphénylpyruvate-dioxygénase (HPPD) (Secor, 1994). Dans les organes matures, le traitement par les tricétones perturbe les mécanismes de dissipation de l'énergie en excès et entraîne une production de superoxydes qui vont être létaux pour la cellule végétale. Ce stress oxydant est accru lors d'un stress lumineux.

Comme pour tous les produits phytosanitaires, les principaux phénomènes de dissipation de la sulcotrione sont la biotransformation, la photolyse et l'hydrolyse. La contribution de ces différentes voies dépend des conditions de terrain. Le 1,9-dione-3,4-dihydro-6-méthylsulfonyl xanthène (XDD) est exclusivement produit par photolyse de la forme moléculaire de la sulcotrione (ter Halle *et al.*, 2006). Cela signifie que, dans les conditions naturelles, la formation de XDD ne peut avoir lieu qu'après la pulvérisation de la sulcotrione à la surface des feuilles. En effet, les formulations de la sulcotrione sont plutôt acides. Ainsi, après évaporation de l'eau, une proportion importante de la sulcotrione se trouvant sous forme moléculaire va subir la réaction de photo-cyclisation décrite par ter Halle *et al.* (2006). Une fois la sulcotrione transférée dans un milieu aqueux par ruissellement, elle passe totalement en forme anionique puisque son pKa est 3,2 et que le pH des eaux naturelles est proche de 7. Sous forme anionique la réaction de photolyse est totalement différente. Elle consiste principalement en une lente photo-hydrolyse avec formation de l'acide 2-chloro-4-méthylsulfonylbenzoïque (CMBA) (Cherrier *et al.*, 2004; Rouchaud *et al.*, 1998b) et de 1,3-cyclohexanedione (CHD) ne présentant pas d'activité herbicide.

Nous avons utilisé cette photo-réactivité tout à fait spécifique de la sulcotrione sous sa forme moléculaire pour mettre au point une méthode de production photochimique de XDD. Dans l'acétonitrile, la sulcotrione est sous forme moléculaire, elle se phototransforme donc en XDD et l'absence d'eau évite la formation de CMBA. L'irradiation est réalisée en lumière polychromatique entre 290 et 450 nm, c'est-à-dire à des longueurs d'onde où XDD absorbe. Nous avons donc suivi avec précision l'évolution de la réaction pour la stopper avant que XDD ne se photolyse à son tour. XDD est instable à l'obscurité en présence d'eau et s'hydrolyse lentement pour produire le HMBA et le CHD. Le bilan chimique montre que cette hydrolyse nécessite deux molécules d'eau. On peut donc supposer qu'elle se fait en deux étapes. Nous avons effectivement observé des composés intermédiaires qui n'ont cependant pas été caractérisés. Nous avons constaté que cette hydrolyse est nettement accélérée en présence des racines d'*Allium Cepa*. Là-aussi une étude détaillée permettrait sans doute d'expliquer ces phénomènes. Cela sort du cadre de notre étude.

Nous montrons que la transformation de la sulcotrione en HMBA nécessite une étape photochimique puis une étape d'hydrolyse. Ces réactions peuvent tout à fait se produire

successivement dans les conditions naturelles si l'on admet qu'une fois produit à la surface des feuilles, XDD peut migrer vers un milieu aqueux par lessivage des feuilles et du sol. De plus le XDD peut être absorbé par les feuilles de la plante et être modifié soit par des complexes enzymatiques, s'ils existent, soit hydrolysé dans les compartiments de la cellule végétale. Sa formation à la surface des feuilles de maïs après traitement à la sulcotrione sous la forme commerciale Mikado® a bien été démontrée dans une étude au champ (ter Halle *et al.*, 2007). Une autre voie de formation de HMBA peut aussi être envisagée : la photo-hydrolyse du CMBA, c'est-à-dire, la substitution de Cl par OH. La photo-substitution d'un halogène par le groupement « OH » lors d'une irradiation en solution aqueuse est une réaction effectivement bien connue pour de nombreuses molécules aromatiques halogénées (Boule *et al.*, 1999) et a déjà pu être observée lors des travaux de Manojlovi lorsque le CMBA subit une oxydation ou une photo-catalyse (Manojlovi *et al.*, 2013). Vu que le CMBA est l'un des principaux produits de phototransformation dans l'eau et le principal produit de biodégradation dans les sols, cette voie alternative de production de HMBA est tout à fait possible en milieu naturel.

4. Dynamique de toxicité

L'un des objectifs de nos travaux a été de réaliser le suivi d'une molécule soumise à un stress environnemental et de déterminer le niveau de toxicité des produits issus de sa transformation.

Nos travaux d'analyse de la toxicité de la sulcotrione et de ses produits de transformation ont pu mettre en évidence que chacune des molécules étudiées présente une toxicité propre. En effet les profils de toxicité, que ce soit pour l'indice mitotique ou pour la fréquence des anomalies, révèlent que la sulcotrione et ses produits de transformation n'induisent pas les mêmes processus de toxicité. Ces différents modes d'action peuvent s'expliquer par leurs différences de structure moléculaire.

Nos travaux montrent qu'un principe actif, ayant une activité connue, peut provoquer des effets secondaires indésirables et que les produits de transformation de cette molécule peuvent avoir des actions spécifiques différentes. Les produits de phototransformation de la sulcotrione se sont avérés plus toxiques que la molécule mère dans nos conditions expérimentales. Le CMBA semble interférer avec le fonctionnement des microtubules ce qui entraîne la formation de "c-mitosis". XDD quant à lui entraîne

l'apparition de micronoyaux. Les molécules ayant des modes d'action différents peuvent aussi avoir des effets additifs pouvant conduire à une toxicité aiguë du mélange obtenu et cela même pour de faibles concentrations (Osano *et al.*, 2002).

Il faut noter que les voies de dispersion peuvent aussi s'appliquer aux produits de transformation en condition naturelle. Cela implique que ces produits peuvent être mobiles et se transformer à leur tour. C'est le cas de la molécule XDD qui peut s'hydrolyser.

Le modèle de transformation de la sulcotrione présenté dans nos travaux pourrait s'étendre vers d'autres molécules communément utilisées en agriculture et pose de nouvelles problématiques sur le suivi et la toxicité des produits de dégradation en milieu naturel (Escher et Fenner, 2011).

5. HMBA, un stimulateur de croissance issu d'un pesticide

La photodégradation de la sulcotrione sous forme moléculaire peut conduire à la formation du HMBA qui dans certaines conditions affecte le bon déroulement du développement de certaines espèces végétales. Nos expérimentations ont montré que cette molécule provoque une augmentation de la croissance racinaire chez certaines monocotylédones avec une augmentation de l'indice mitotique. La détermination de sa formule chimique montre qu'il s'agit d'une molécule dont la structure est proche de celle de l'acide salicylique (SA).

L'acide salicylique (acide 2-hydroxybenzoïque) est connu pour être un messager cellulaire végétal intervenant dans la réponse aux stress. Cette molécule est nécessaire à la résistance locale et systémique des plantes et permet la mise en place de la réaction d'hypersensibilité (Durner *et al.*, 1997; Kumar, 2014). Cette phytohormone peut aussi intervenir sur des régulations de croissance qui se traduisent par une augmentation des croissances radiales et apicales et par l'augmentation du nombre de feuilles (Hussein *et al.*, 2007). On peut aussi observer une croissance racinaire stimulée par SA chez de nombreuses espèces végétales comme *Tagetes erecta*, *Daucus carota*, *Raphanus sativus* ou *Beta vulgaris* (Hayat *et al.*, 2010). Cette croissance racinaire est caractérisée par un indice mitotique augmenté (Hayat *et al.*, 2013; Shakirova *et al.*, 2003) et une élongation cellulaire stimulée (Vanacker *et al.*, 2001). L'acide salicylique peut donc influencer la croissance végétative à plusieurs niveaux, de plus elle est une hormone clef dans cette régulation lorsque la plante

doit faire face à un stress. Des études ont aussi été réalisées sur des dérivés de l'acide salicylique, comme l'acide acétylsalicylique ou l'acide gentisique qui induisent des effets comparables sur la croissance ainsi que sur la photosynthèse (Khan *et al.*, 2003). HMBA, étant un analogue proche de l'acide salicylique, il serait donc capable de mimer les propriétés de l'hormone.

SA et ses analogues peuvent aussi agir sur la photosynthèse (Uzunova et Popova, 2000). Cette propriété de SA pourrait expliquer le blanchiment des jeunes plantules d'*Arabidopsis* qui a été observé durant nos expérimentations. Il a aussi été remarqué que SA peut avoir un rôle important dans la sénescence des feuilles (Morris *et al.*, 2000) ainsi que dans le développement lors d'un stress biotique (Rate et Greenberg, 2001; Rate *et al.*, 1999; Vanacker *et al.*, 2001). Ces auteurs ont pu observer l'apparition de cellules dédifférenciées et incolores formant un amas désorganisé. Cette formation de cal cellulaire que l'on a pu observer chez *Arabidopsis thaliana* après 45 jours de traitement pourrait donc être causée par l'action de SA ou d'un de ses dérivés (HMBA) mais des travaux plus approfondis dans ce domaine sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

De plus, certains auteurs ont pu observer un gain de tolérance à certains stress chimiques lorsque des plantes sont préalablement stimulées par SA. On peut ainsi observer une baisse des effets génotoxiques de certains métaux lourds après un prétraitement avec SA (Hayat *et al.*, 2010; Janda *et al.*, 2007) ou encore face à la toxicité d'un herbicide (Singh *et al.*, 2012). On peut donc imaginer que lorsque la sulcotrione se transforme en HMBA ce dernier contrebalancerait l'effet toxique des autres produits de dégradation de la sulcotrione et permettrait aux végétaux impactés de mieux tolérer ces stress chimiques.

Il est aussi intéressant de remarquer que les résultats préliminaires sur HMBA ont mis en évidence un caractère stimulateur de croissance de cet analogue à l'acide salicylique chez des espèces végétales monocotylédones alors qu'on remarque un effet négatif sur la croissance chez des espèces dicotylédones. HMBA aurait à la fois un effet bénéfique sur des monocotylédones en stimulant leur croissance racinaire, tout en ayant un effet herbicide sur les dicotylédones en perturbant leur développement et en limitant leur propagation.

Conclusions

Nos études ont tout d'abord confirmés la toxicité de la sulcotrione sur le modèle *Allium cepa*. Les premières observations de cette toxicité avaient été faites sur *Vicia faba* lors d'études antérieures (Sta *et al.*, 2012). La sulcotrione induit de nombreuses anomalies chromosomiques et une baisse significative de l'indice mitotique. Ces études montrent que l'effet génotoxique de la sulcotrione se stabilise pour les concentrations fortes et semble être lié à un mécanisme saturable que ce soit chez *Allium* ou *Vicia*.

Nos travaux se sont surtout focalisés sur la toxicité des produits de transformation de la sulcotrione et plus précisément les photoproduits de la sulcotrione sous forme moléculaire. Ses produits de transformation dans ces conditions sont principalement la molécule XDD et en moindre quantité la molécule CMBA. Ce dernier est obtenu par hydrolyse photo-assistée de la sulcotrione et n'est possible qu'en milieu aqueux. XDD est un produit typique de la phototransformation de la sulcotrione à un pH inférieur à 3. La cyclisation de la sulcotrione n'est possible que lorsque celle-ci est sous forme moléculaire, ce qui est généralement le cas en conditions naturelles. Ces deux molécules possèdent un profil et une dynamique de toxicité qui leur sont spécifiques. Une génotoxicité relativement forte a pu être montrée pour le composé XDD avec l'apparition d'anomalies chromosomiques et la formation de micronoyaux en grande quantité. Une baisse importante de l'indice mitotique est aussi observée. Les traitements par CMBA entraînent des anomalies chromosomiques et une baisse de l'indice mitotique moins importante que pour XDD. Mais ce qui est remarquable avec les traitements par CMBA, c'est la formation de figure de mitose de type « c-mitosis » qui sont généralement liée à la désorganisation des réseaux de microtubules.

L'apparition et l'accumulation de ces molécules doivent donc être fortement évitées dans l'environnement et des pratiques culturales améliorées seraient à envisager. On pourrait par exemple changer le pH des solutions commerciales de la sulcotrione pour que celle-ci soit sous forme anionique et ainsi empêcher la transformation en XDD. L'utilisation de photoprotecteurs serait aussi une solution, cela permettrait de rallonger la demi-vie de la sulcotrione et d'augmenter la fenêtre d'utilisation de cet herbicide tout en diminuant les doses utilisées.

Durant nos expérimentations nous avons pu observer que la molécule XDD n'est pas stable en milieu aqueux. Les différentes analyses ont permis l'identification des produits d'hydrolyse de XDD : les molécules HMBA et CHD. Cette hydrolyse est accélérée lorsqu'elle est réalisée en présence de l'exsudat racinaire d'*Allium cepa*. Il est envisageable que cette catalyse soit provoquée par des enzymes provenant soit de la racine d'*Allium* soit des microorganismes se développant habituellement autour de ses racines. Il est aussi possible de transformer le CMBA en HMBA en substituant le chlore par un éno, cette réaction est possible par photocatalyse.

Durant nos études sur la molécule HMBA nous avons pu observer une stimulation importante de la croissance racinaire chez plusieurs modèles végétaux comme *Allium cepa*, *Iris hollandica*, *Gladiolus grandiflorus* et *Zea mays*. Chez d'autres espèces dicotylédones comme *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* L. et *Populus trimula* × *alba*, un blanchiment des jeunes feuilles a pu être observé ainsi qu'une désorganisation cellulaire au niveau aérien chez *Arabidopsis* lors des traitements les plus concentrés. En s'appuyant sur des observations de la littérature et la structure chimique de HMBA nous avons conclu que cette molécule mime l'action de l'acide salicylique. Des études complémentaires sur ses propriétés sont en cours sur modèle animal pour déterminer si cette molécule peut avoir un rôle similaire ou inédit par rapport à l'acide salicylique.

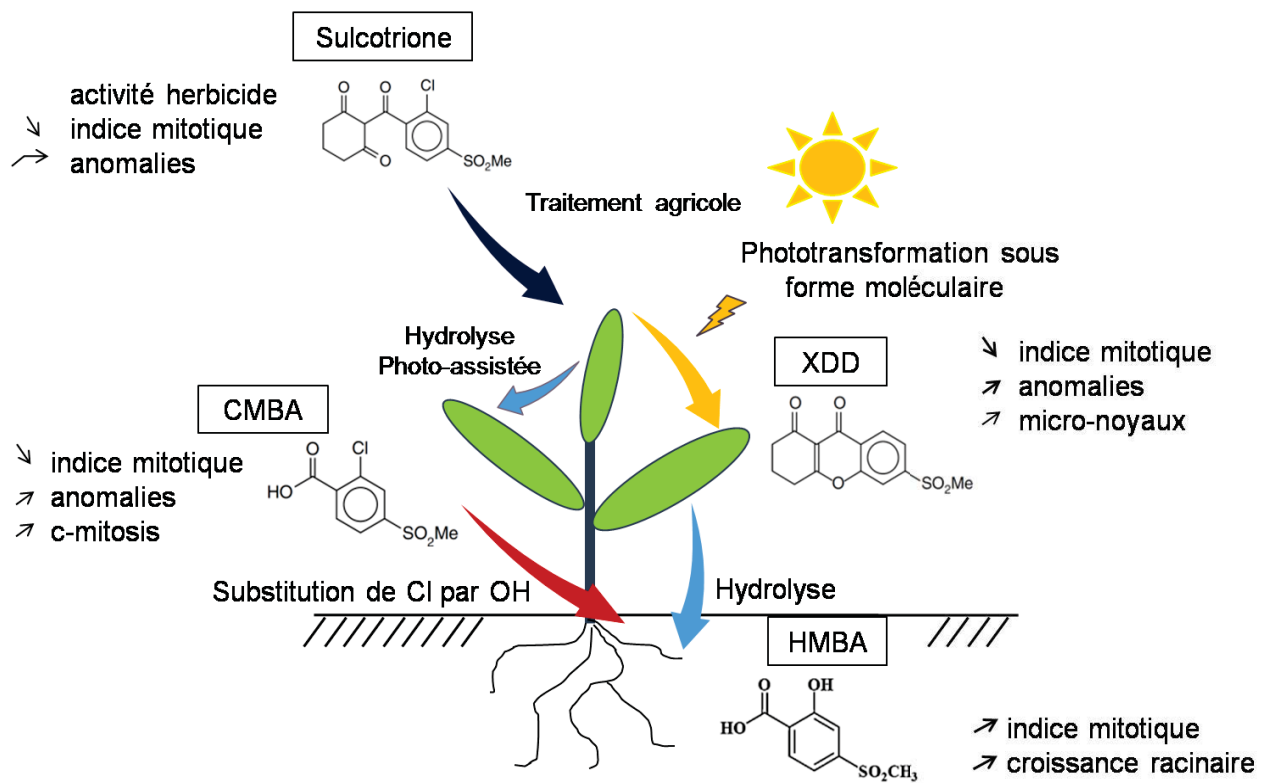


Schéma récapitulatif de l'effet de la sulcotrione et de ses produits de transformation chez le végétal.

Références Bibliographiques

- Aubertot, J. N. and Carpentier, A.** (2011). Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. *Expertise scientifique collective Inra-Cemagref* (décembre 2005).
- Bandyopadhyay, A. and Mukherjee, A.** (2011). Sensitivity of *Allium* and *Nicotiana* in cellular and acellular comet assays to assess differential genotoxicity of direct and indirect acting mutagens. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 860–865.
- Benoît, M., Bonicelli, B., Guichard, L., Delorme, R., Faloya, V. and Ruelle, B.** (2005). Connaissance de l'utilisation des pesticides. *Pestic. Agric. Environ. réduire l'utilisation des Pestic. en limiter les impacts environnementaux, Expert. Sci. Collect. INRA CEMAGREF*.
- Bichler, J., Cavin, C., Simic, T., Chakraborty, A., Ferk, F., Hoelzl, C., Schulte-Hermann, R., Kundi, M., Haidinger, G., Angelis, K., et al.** (2007). Coffee consumption protects human lymphocytes against oxidative and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate (Trp-P-2) induced DNA-damage: Results of an experimental study with human volunteers. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 1428–1436.
- Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P. and Marcos, R.** (2011). Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* **26**, 19–26.
- Boule, P., Othmen, K., Richard, C., Szczepanik, B. and Grabner, G.** (1999). Phototransformation of halogenoaromatic derivatives in aqueous solution. *Int. J. Photoenergy* **1**, 49–54.
- Brissett, N. C. and Doherty, A. J.** (2009). Repairing DNA double-strand breaks by the prokaryotic non-homologous end-joining pathway. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 539–545.
- Burkhard, N. and Guth, J. A.** (1976). Photodegradation of atrazine, atraton and ametryne in aqueous solution with acetone as a photosensitiser. *Pestic. Sci.* **7**, 65–71.
- Burlinson, B., Tice, R. R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S. Y., Collins, A. R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T. S., Nakajima, M., et al.** (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **627**, 31–35.
- Burrows, H. D., Canle L, M., Santaballa, J. A. and Steenken, S.** (2002). Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **67**, 71–108.
- Calow, P. and Forbes, V. E.** (2003). Peer Reviewed: does ecotoxicology inform ecological risk assessment? *Environ. Sci. Technol.* **37**, 146A–151A.
- Cavas, T. and Konen, S.** (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* **22**, 263–268.

- Cederholm, H. M., Iyer-Pascuzzi, A. S. and Benfey, P. N.** (2012). Patterning the primary root in *Arabidopsis*. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**, 675–691.
- Chaabane, H., Cooper, J.-F. F., Azouzi, L. and Coste, C.-M. M.** (2005). Influence of soil properties on the adsorption-desorption of sulcotrione and its hydrolysis metabolites on various soils. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4091–4095.
- Chaabane, H., Vulliet, E., Calvayrac, C., Coste, C. and Cooper, J.** (2008). Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils. *Pest Manag. Sci.* **64**, 86–93.
- Chamberlain, E., Shi, H., Wang, T., Ma, Y., Fulmer, A. and Adams, C.** (2012). Comprehensive screening study of pesticide degradation via oxidation and hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 354–363.
- Cherrier, R., Perrin-Ganier, C. and Schiavon, M.** (2004). Degradation of sulcotrione in a brown soil amended with various organic matters. *Agronomie* **24**, 29–33.
- Chiron, S., Comoretto, L., Rinaldi, E., Maurino, V., Minero, C. and Vione, D.** (2009). Pesticide by-products in the Rhone delta (Southern France). The case of 4-chloro-2-methylphenol and of its nitroderivative. *Chemosphere* **74**, 599–604.
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C. and Stetina, R.** (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* **23**, 143–51.
- Cools, K., Bulcke, R., Debussche, B. and Callens, D.** (1999). Response of replacement crops to soil-applied sulcotrione. *Meded. Landbouwk. en Toegepaste Biol. Wet. Univ. Gent* **64**, 721–726.
- Copley, S. D.** (2009). Evolution of efficient pathways for degradation of anthropogenic chemicals. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 559–566.
- Cortés-Gutiérrez, E. I., Dávila-Rodríguez, M. I., Fernández, J. L., López-Fernández, C., Gosálbez, A. and Gosálvez, J.** (2011). New application of the comet assay: chromosome--comet assay. *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 655–60.
- Culleres, D. B., Boesten, J., Bolognesi, C., Boobis, A., Büchert, A., Coggon, D., Hardy, A., Hart, A., Köpp, H., Liess, M., *et al.*** (2008). Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies. *EFSA J.* **704**, 1–84.
- Dane, F. and Dalgic, O.** (2005). The effects of fungicide benomyl (benlate) on growth and mitosis in onion (*Allium cepa* L.) root apical meristem. *Acta Biol. Hung.* **56**, 119–128.
- De Souza, M. L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M. J. and Wackett, L. P.** (1998). The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *J. Bacteriol.* **180**, 1951–1954.

- Dewailly, É., Ayotte, P., Bruneau, S., Gingras, S., Belles-Isles, M. and Roy, R.** (2000). Susceptibility to infections and immune status in Inuit infants exposed to organochlorines. *Environ. Health Perspect.* **108**, 205–211.
- Doublet, J., Mamy, L. and Barriuso, E.** (2009). Delayed degradation in soil of foliar herbicides glyphosate and sulcotrione previously absorbed by plants: consequences on herbicide fate and risk assessment. *Chemosphere* **77**, 582–9.
- Durner, J., Shah, J. and Klessig, D. F.** (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **2**, 266–274.
- EFSA** (2010). *Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) No 396 / 2005*.
- El Gaini, L., Meghea, A. and Bakasse, M.** (2010). Phototransformation of pesticide in the presence of moroccan natural phosphate in aqueous solution. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* **12**, 1981–1985.
- Eleftheriou, E. P., Adamakis, I.-D. S. and Melissa, P.** (2012). Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L. *Protoplasma* **249**, 401–16.
- Escher, B. I. and Fenner, K.** (2011). Recent Advances in Environmental Risk Assessment of Transformation Products. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 3835–3847.
- Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C., Ceretti, E., Moretti, M. and Monarca, S.** (2007). *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Addit. Contam. Part a-Chemistry Anal. Control Expo. Risk Assess.* **24**, 561–572.
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J. and Iwata, S.** (2004). Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center. *Sci.* **303**, 1831–1838.
- Fiskesjö, G.** (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* **102**, 99–112.
- Flower, K. B., Hoppin, J. A., Lynch, C. F., Blair, A., Knott, C., Shore, D. L. and Sandler, D. P.** (2004). Cancer risk and parental pesticide application in children of Agricultural Health Study participants. *Environ. Health Perspect.* **112**, 631–635.
- García, N. A. and Amat-Guerri, F.** (2005). Photodegradation of hydroxylated N-heteroaromatic derivatives in natural-like aquatic environments: A review of kinetic data of pesticide model compounds. *Chemosphere* **59**, 1067–1082.
- Gaulden, M. E.** (1987). Hypothesis: some mutagens directly alter specific chromosomal proteins (DNA topoisomerase II and peripheral proteins) to produce chromosome stickiness, which causes chromosome aberrations. *Mutagenesis* **2**, 357–365.
- Glei, M., Hovhannisyan, G. and Pool-Zobel, B. L.** (2009). Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: Review. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **681**, 33–43.

- Gopalan, H. N. B.** (1999). Ecosystem health and human well being: The mission of the international programme on plant bioassays. In *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, pp. 99–102.
- Graillot, V., Takakura, N., Hegarat, L. Le, Fessard, V., Audebert, M. and Cravedi, J.** (2012). Genotoxicity of Pesticide Mixtures Present in the Diet of the French Population. *Environ. Mol. Mutagen.* **53**, 173–184.
- Grant, W. F.** (1982). Chromosome aberration assays in *Allium*. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **99**, 273–291.
- Grant, W. F.** (1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **310**, 175–185.
- Grant, W. F. and Salamone, M. F.** (1994). Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **310**, 187–209.
- Grippa, G. D., Nati, N. and Matsumoto, S. T.** (2012). Evaluation of Water Samples from a River by Cytologic Analysis in *Allium cepa*. *Cytologia (Tokyo)*. **77**, 3–9.
- Grisolia, C. K., Bilich, M. R. and Formigli, L. M.** (2004). A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **59**, 123–126.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A.** (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ. Exp. Bot.* **68**, 14–25.
- Hayat, S., Ahmad, A. and Alyemeni, M. N.** (2013). *SALICYLIC ACID: Plant Growth and Development*. Springer.
- Hebert, P. D. N. and Luiker, M. M.** (1996). Genetic effects of contaminant exposure - Towards an assessment of impacts on animal populations. *Sci. Total Environ.* **191**, 23–58.
- Helbock, H. J., Beckman, K. B., Shigenaga, M. K., Walter, P. B., Woodall, A. A., Yeo, H. C. and Ames, B. N.** (1998). DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 288–293.
- Hellyer, R. O.** (1968). The occurrence of β -triketones in the steam-volatile oils of some myrtaceous Australian plants. *Aust. J. Chem.* **21**, 2825–2828.
- Hernández, A. F., Parrón, T., Tsatsakis, A. M., Requena, M., Alarcón, R. and López-Guarnido, O.** (2012). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology*.

- Hidalgo, A., Gonzalez-Reyes, J. A., Navas, P. and Garcia-Herdugo, G.** (1989). Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by protham and chlorprotham. *Cytobios* **57**, 7–14.
- Hirt, R., Schmitt, R., Searle, N. and Sullivan, A.** (1960). Ultraviolet spectral energy distribution of natural sunlight and accelerated test light sources. *J. Opt. Soc. Am.* **50**, 706–713.
- Hussein, M. M., Balbaa, L. K. and Gaballah, M. S.** (2007). Salicylic Acid and Salinity Effects on Growth of Maize Plants. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* **3**, 321–328.
- Ivie, G. W. and Casida, J. E.** (1971). Photosensitizers for the accelerated degradation of chlorinated cyclodienes and other insecticide chemicals exposed to sunlight on bean leaves. *J. Agric. Food Chem.* **19**, 410–416.
- Janda, T., Horváth, E., Szalai, G. and Pálldi, E.** (2007). Role of Salicylic Acid in the Induction of Abiotic Stress Tolerance. In *Salicylic Acid: A Plant Hormone*, pp. 91–150.
- Ji, Q., Yang, H. and Zhang, X.** (1999). *Vicia* root-micronuclei assays on the clastogenicity of water samples from the Kui River near Xuzhou city, People's Republic of China. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **426**, 133–135.
- Jiang, W., Liu, D. and Li, H.** (2000). Effects of Cu^{2+} on root growth, cell division, and nucleolus of *Helianthus annuus* L. *Sci. Total Environ.* **256**, 59–65.
- Jović, M., Manojlović, D., Stanković, D., Dojčinović, B., Obradović, B., Gašić, U. and Roglić, G.** (2013). Degradation of triketone herbicides, mesotrione and sulcotrione, using advanced oxidation processes. *J. Hazard. Mater.* **260**, 1092–1099.
- Katagi, T.** (2002). Abiotic hydrolysis of pesticides in the aquatic environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **175**, 79–261.
- Keil, J. E., Caddy, R. G., Loadholt, C. B., Hennigar, G. R. and Walker, E. M.** (1976). Prolonged ingestion of commercial DDT and PCB; effects on progesterone levels and reproduction in the mature female rat. *Arch. Environ. Contam.* **3**, 479–490.
- Khan, W., Prithviraj, B. and Smith, D. L.** (2003). Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *J. Plant Physiol.* **160**, 485–492.
- Khandoudi, N., Porte, P., Chtourou, S., Nesslany, F., Marzin, D. and Le Curieux, F.** (2009). The presence of arginine may be a source of false positive results in the Ames test. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **679**, 65–71.
- Kitchin, K. T., Brown, J. L. and Kulkarni, A. P.** (1993). Predicting rodent carcinogenicity of Ames test false positives by in vivo biochemical parameters. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **290**, 155–164.
- Koppen, G. and Verschaeve, L.** (1996). The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutat. Res. - Environ. Mutagen. Relat. Subj.* **360**, 193–200.

- Kovalchuk, O., Titov, V., Hohn, B. and Kovalchuk, I.** (2001). A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. *Nat Biotech* **19**, 568–572.
- Kruman, I. I., Kumaravel, T. S., Lohani, A., Pedersen, W. A., Cutler, R. G., Kruman, Y., Haughey, N., Lee, J., Evans, M. and Mattson, M. P.** (2002). Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **22**, 1752–1762.
- Kumar, D.** (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Sci.* **228**, 127–134.
- Lah, B., Zinko, B., Tisler, T. and Marinsek-Logar, R.** (2005). Genotoxicity detection in drinking water by Ames test, Zimmermann test and Comet assay. *Acta Chim. Slov.* **52**, 341–348.
- Lee, D. L. and Michaely, W. J.** (1988). Certain 2-(substituted benzoyl)-5-(substituted or unsubstituted phenyl)-1,3-cyclohexanediones.
- Lee, D. L., Knudsen, C. G., Michael, W. J., Ngu, N. H., Carter, C. G., Cromartie, T. H., Shribbs, J. M. and Fraser, T.** (1998). The Structure – Activity Relationships of the Triketone Class of HPPD Herbicides. *Pestic. Sci.* **54**, 377–384.
- Lieber, M. R.** (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181–211.
- Liman, R., Akyil, D., Eren, Y. and Konuk, M.** (2010). Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* test. *Chemosphere* **80**, 1056–1061.
- Liman, R., Cigerci, I. H., Akyil, D., Eren, Y. and Konuk, M.** (2011). Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and Comet tests. *Pestic. Biochem. Physiol.* **99**, 61–64.
- Luellen, D. R., Vadas, G. G. and Unger, M. A.** (2006). Kepone in James River fish: 1976–2002. *Sci. Total Environ.* **358**, 286–297.
- Luo, Y., Henle, E. S. and Linn, S.** (1996). Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated Fenton reactions. The deoxycytidine family. *J. Biol. Chem.* **271**, 21167–21176.
- Ma, T. H.** (1999). The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. In *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, pp. 103–106.
- Ma, T. H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E. V., Arreola, G. A. and Zhang, H.** (1995a). The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat. Res.* **334**, 185–195.

- Ma, T. H., Xu, Z. D., Xu, C. G., McConnell, H., Rabago, E. V., Arreola, G. A. and Zhang, H. G.** (1995b). The improved *Allium Vicia* root-tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental-pollutants. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* **334**, 185–195.
- Ma, T. H., Xu, C., Liao, S., McConnell, H., Jeong, B. S. and Won, C. D.** (1996). In situ monitoring with the *Tradescantia* bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and an incinerator. *Mutat. Res. - Environ. Mutagen. Relat. Subj.* **359**, 39–52.
- Maluszynska, J. and Juchimiuk, J.** (2005). Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **56**, 177–184.
- Mamy, L., Barriuso, E. and Gabrielle, B.** (2005). Environmental fate of herbicides trifluralin, metazachlor, metamilon and sulcotrione compared with that of glyphosate, a substitute broad spectrum herbicide for different glyphosate-resistant crops. *Pest Manag. Sci.* **61**, 905–916.
- Manthe, B., Schulz, M. and Schnabl, H.** (1992). Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements of *Vicia faba* L.: Evidence for salicylic acid metabolism. *J. Chem. Ecol.* **18**, 1525–1539.
- Marcano, L., Carruyo, I., Del Campo, A. and Montiel, X.** (2002). Effect of Cadmium on the Nucleoli of Meristematic Cells of Onion *Allium cepa* L: An Ultrastructural Study. *Environ. Res.* **88**, 30–35.
- Mayonado, D. J., Hatzios, K. K., Orcutt, D. M. and Wilson, H. P.** (1989). Evaluation of the mechanism of action of the bleaching herbicide sc-0051 by HPLC analysis. *Pestic. Biochem. Physiol.* **35**, 138–145.
- Meyer, A., Chrisman, J., Moreira, J. C. and Koifman, S.** (2003). Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Environ. Res.* **93**, 264–271.
- Miles, C. I. and Schenk, G. H.** (1970). Fluorescence of acetylsalicylic acid in solution and its measurement in presence of salicylic acid. *Anal. Chem.* **42**, 656–659.
- Moran, G. R.** (2005). 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 117–128.
- Morris, K., MacKerness, S. A., Page, T., John, C. F., Murphy, A. M., Carr, J. P. and Buchanan-Wollaston, V.** (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* **23**, 677–685.
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J. M., Jha, A. N. and Costil, K.** (2013). Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* **128**, 67–78.
- Munnecke, D. M.** (1976). Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides, a possible pesticide disposal method. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 7–13.

- Navarrete, M. H., Carrera, P., De Miguel, M. and Consuelo De La Torre** (1997). A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **389**, 271–277.
- Nicoloff, H. and Gecheff, K.** (1976). Methods of scoring induced chromosome structural changes in barley. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **34**, 233–244.
- Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H. J. C., Pastor, D. and Bleeker, E. a. J.** (2002). Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut.* **119**, 195–202.
- Ostling, O. and Johanson, K. J.** (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291–298.
- Phugare, S. S., Gaikwad, Y. B. and Jadhav, J. P.** (2012). Biodegradation of acephate using a developed bacterial consortium and toxicological analysis using earthworms (*Lumbricus terrestris*) as a model animal. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **69**, 1–9.
- Rank, J.** (2003). The method of *Allium* anaphase / telophase chromosome aberration assay. *Ekologija* **1**, 38–42.
- Rank, J. and Nielsen, M. H.** (1993). A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex-mixtures. *Hereditas* **118**, 49–53.
- Rank, J. and Nielsen, M. H.** (1997). *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* **390**, 121–127.
- Rate, D. N. and Greenberg, J. T.** (2001). The *Arabidopsis* aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant J.* **27**, 203–211.
- Rate, D. N., Cuenca, J. V, Bowman, G. R., Guttman, D. S. and Greenberg, J. T.** (1999). The Gain-of-Function *Arabidopsis* *acd6* Mutant Reveals Novel Regulation and Function of the Salicylic Acid Signaling Pathway in Controlling Cell Death , Defenses , and Cell Growth. *Plant Cell* **11**, 1695–1708.
- Rodríguez, E. M., Parra, M. T., Rufas, J. S. and Suja, J. a** (2001). Colchicine promotes a change in chromosome structure without loss of sister chromatid cohesion in prometaphase I-arrested bivalents. *Chromosoma* **110**, 478–486.
- Rouchaud, J., Thirion, a, Callens, D. and Bulcke, R.** (1996). Soil dissipation of the post-emergence herbicide sulcotrione in maize crops treated with organic fertilizers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**, 398–405.
- Rouchaud, Neus, Callens and Bulcke** (1998a). Sulcotrione soil persistence and mobility in summer maize and winter wheat crops. *Weed Res.* **38**, 361–371.

- Rouchaud, J., Neus, O., Bulcke, R., Cools, K. and Eelen, H.** (1998b). Sulcotrione Soil Metabolism in Summer Corn Crops. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **61**, 669–676.
- Sandmann, G., Schmidt, A. and Linden, H.** (2013). Phytoene Desaturase , the Essential Target for Bleaching Herbicides. *Weed Sci. Soc. Am.* **39**, 474–479.
- Santos, S. J., Singh, N. P. and Natarajan, A. T.** (1997). Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp. Cell Res.* **232**, 407–411.
- Schmidt, W. and Beerhues, L.** (1997). Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. *FEBS Lett.* **420**, 143–146.
- Schmidt, W., Peters, S. and Beerhues, L.** (2000). Xanthone 6-hydroxylase from cell cultures of *Centaureum erythraea* RAFN and *Hypericum androsaemum* L. *Phytochemistry* **53**, 427–431.
- Secor, J.** (1994). Inhibition of barnyardgrass 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by Sulcotrione. *Plant Physiol.* **106**, 1429–1433.
- Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A. and Fatkhutdinova, D. R.** (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.* **164**, 317–322.
- Shugart, L. R.** (2000). DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology* **9**, 329–340.
- Singer, A. C., Crowley, D. E. and Thompson, I. P.** (2003). Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends Biotechnol.* **21**, 123–30.
- Singh, B. K. and Walker, A.** (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 428–471.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L.** (1988). A simple technique for quantitation of low levels of {DNA} damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184–191.
- Singh, N. B., Yadav, K. and Amist, N.** (2012). Mitigating effects of salicylic acid against herbicidal stress. *J. Stress Physiol. Biochem.* **8**, 27–35.
- Singh, V. P., Kumar, J., Singh, S. and Prasad, S. M.** (2014). Dimethoate modifies enhanced UV-B effects on growth, photosynthesis and oxidative stress in mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings: implication of salicylic acid. *Pestic. Biochem. Physiol.* **116**, 13–23.
- Sogorb, M. A., Carrera, V. and Vilanova, E.** (2004). Hydrolysis of carbaryl by human serum albumin. *Arch. Toxicol.* **78**, 629–634.
- Sørensen, S. R., Bending, G. D., Jacobsen, C. S., Walker, A. and Aamand, J.** (2003). Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**, 1–11.

- Sparrow, A. H., Underbrink, A. G. and Rossi, H. H.** (1972). Mutations induced in *Tradescantia* by small doses of x-rays and neutrons: analysis of dose-Response curves. *Science* **176**, 916–918.
- Sta, C., Ledoigt, G., Ferjani, E. and Goupil, P.** (2012). Exposure of *Vicia faba* to sulcotrione pesticide induced genotoxicity. *Pestic. Biochem. Physiol.* **103**, 9–14.
- Steinkellner, H., Mun-Sik, K., Helma, C., Ecker, S., Ma, T.-H., Horak, O., Kundi, M. and Knasmüller, S.** (1998). Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.* **31**, 183–191.
- Tedesco, S. B., Dail, H. and Iv, L.** (2003). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test.
- Ter Halle, A., Drncova, D. and Richard, C.** (2006). Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 2989–2995.
- Ter Halle, A., Piquet, A. and Richard, C.** (2007). An actual scenario that demonstrates sulcotrione photodegradation on maize leaves after spraying. *Environ. Chem.* **4**, 256.
- Ter Halle, A., Wiszniowski, J., Hitmi, A., Ledoigt, G., Bonnemoy, F., Bonnet, J.-L. L., Bohatier, J. and Richard, C.** (2009). Photolysis of the herbicide sulcotrione: formation of a major photoproduct and its toxicity evaluation. *Pest Manag. Sci.* **65**, 14–18.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. and Sasaki, Y. F.** (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. In *Environmental and Molecular Mutagenesis*, pp. 206–221.
- Topp, E.** (2003). Bacteria in agricultural soils: Diversity, role and future perspectives. *Can. J. Soil Sci.* **83**, 303–309.
- Tron, I., Piquet, O. and Cohuet, S.** (2001). Effets chroniques des pesticides sur la santé : état actuel des connaissances. *Rennes, Obs. Régional la Santé Bretagne* 88.
- Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K. and Sasaki, Y. F.** (2001). DNA Damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicol. Sci.* **61**, 92–99.
- Uzunova, A. N. and Popova, L. P.** (2000). Effect of Salicylic Acid on Leaf Anatomy and Chloroplast Ultrastructure of Barley Plants. *Photosynthetica* **38**, 243–250.
- Van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M. and Hall, J. C.** (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Sci.* **51**, 472–495.
- Vanacker, H., Lu, H., Rate, D. N. and Greenberg, J. T.** (2001). A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* **28**, 209–216.
- Vasseur, P. and Cossu-Leguille, C.** (2003). Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* **28**, 711–717.

- Viel, J. F. and Challier, B.** (1995). Bladder cancer among French farmers: does exposure to pesticides in vineyards play a part? *Occup. Environ. Med.* **52**, 587–592.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A. and Klessig, D. F.** (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**, 177–206.
- Weichenthal, S., Moase, C. and Chan, P.** (2010). A review of pesticide exposure and cancer incidence in the agricultural health study cohort. *Environ. Health Perspect.* **118**, 1117–1125.
- Yen, K. M. and Gunsalus, I. C.** (1982). Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 874–878.
- Zepp, R. G. and Cline, D. M.** (1977). Rates of direct photolysis in aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* **11**, 359–366.
- Zhang, P., Sun, H., Yu, L. and Sun, T.** (2013). Adsorption and catalytic hydrolysis of carbaryl and atrazine on pig manure-derived biochars: Impact of structural properties of biochars. *J. Hazard. Mater.* **244-245**, 217–224.

Résumé : Etude de la toxicité de la sulcotrione et de ses produits de photodégradation.

L'objectif de ce travail est l'étude de la plante face aux molécules issues de la phototransformation de la sulcotrione. La recherche d'anomalies a été menée sur des extrémités racinaires d'*Allium cepa* L. var. *aggregatum* par un dénombrement au microscope des anomalies chromosomiques causées par l'ajout des différents xénobiotiques. L'étude a été réalisée en deux temps. Tout d'abord l'impact génotoxique d'un mélange constitué de la sulcotrione et de ses photoproduits a été évalué. Puis les caractéristiques de chaque produit de dégradation ont été analysées indépendamment. Il s'est avéré que la sulcotrione et ses produits de transformation CMBA et XDD ont des caractéristiques de toxicité qui sont spécifiques de chacun d'entre eux, avec une toxicité plus importante pour XDD. Il a été observé que XDD peut s'hydrolyser. Les études sur les produits de seconde génération ont permis d'identifier HMBA qui présente de nombreuses similitudes avec l'acide salicylique et provoque notamment une croissance racinaire accrue chez les espèces monocotylédones testées.

Mots clés : *Allium cepa*, Sulcotrione, Anomalies chromosomiques, photoproduits

Abstract : Study of sulcotrione toxicity and its photoproducts.

Cytotoxicity and genotoxicity of non irradiated and irradiated sulcotrione were investigated in *Allium cepa* test. Then, the cytotoxic effects of 2-chloro-4-mesylbenzoic acid (CMBA) and xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulfonyl (XDD), the two main photoproducts of sulcotrione were investigated at different concentrations. We analyze plant response treated with sulcotrione phototransformation by-products. Chromosomal aberrations were observed in *Allium cepa* root meristems. First, we investigated the genotoxic impact of a sulcotrione mixture and its photoproducts. Then each by-product was independently tested. Sulcotrione CMBA and XDD have specific toxicity, and XDD has a greater toxicity. In our latest analysis we observed that XDD can be hydrolyzed. HMBA was identified as a salicylic acid derivative and can increase root growth in monocotyledonous species.

Key words : *Allium cepa*, Sulcotrione, Chromosomal aberrations, photoproducts